

Aus der  
Klinik für Klauentiere  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Epidemiologische Untersuchungen zur  
Kuhpockenvirusinfektion beim Alpaka (*Vicugna pacos*)**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Almut Prkno  
aus Dresden

Leipzig, 2020

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Alexander Starke

Gutachter: Prof. Dr. Alexander Starke, Klinik für Klauentiere, Universität  
Leipzig, Leipzig

Univ.-Prof. Dr. Thomas Wittek, Universitätsklinik für  
Wiederkäuer, Veterinärmedizinische Universität Wien, Wien

Tag der Verteidigung: 23. Juni 2020

Meiner Familie

in Liebe und Dankbarkeit

# Inhalt

1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Das Alpaka .....	3
2.1.1 Zoologische Einordnung, Herkunft, Nutzung .....	3
2.1.2 Haltung .....	3
2.1.3 Viruserkrankungen bei Neuweltkameliden in Europa .....	4
2.2 Die Kuhpockenvirusinfektion .....	4
2.2.1 Ätiologie .....	4
2.2.2 Wirtsspektrum und Erregerreservoir .....	5
2.2.3 Diagnostik .....	6
2.2.4 Klinisches Erscheinungsbild .....	6
2.2.5 Differentialdiagnosen .....	7
2.2.6 Therapie/Prophylaxe .....	7
2.3 Der MVA-Impfstoff .....	8
2.4 Schlussfolgerung aus der Literaturrecherche und Zielstellung .....	8
3 Publikation 1.....	11
4 Publikation 2.....	28
5 Publikation 3.....	44
6 Diskussion.....	59
7 Zusammenfassung.....	65
8 Summary.....	67
9 Literaturverzeichnis .....	69
10 Danksagung .....	75

## Abkürzungsverzeichnis

CPXV	Kuhpockenvirus, <i>Cowpox virus</i>
CVA	Chorioallantois Vaccinia Virus Ankara
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>enzyme-linked-immunosorbent assay</i>
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur/ <i>European Medicines Agency</i>
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems
IFA/iIFA	indirekter Immunfluoreszenztest, <i>indirect immunofluorescence assay</i>
Kbp	Kilobasenpaare, <i>kilobase pairs</i>
MVA	Modifiziertes Vaccinia Virus Ankara, <i>modified vaccinia virus Ankara</i>
maAbs	maternale Antikörper, <i>maternal antibodies</i>
NWK/SACs	Neuweltkameliden/ <i>South American camelids</i>
OPV	Orthopockenviren, <i>Orthopoxvirus</i>
PCR	Polymerase – Kettenreaktion
VACV	Vaccinia Virus
VARV	Variola Virus



# 1 Einleitung

Alpakas (*Vicugna pacos*), ursprünglich aus den Anden Südamerikas stammend, haben sich in den letzten 40 Jahren in unseren Breiten auf Grund ihrer vielfältigen Nutzungsmöglichkeiten zu beliebten Hobbytieren und landwirtschaftlichen Nutztieren etabliert (GAULY et al. 2011, HALSBY et al. 2017). Die Tierzahlen steigen in Europa und auch in Deutschland stetig an, es fehlt jedoch an exakt erhobenen Daten. Im Vergleich zu in Deutschland heimischen Haus- und Nutztierarten ist diese Spezies noch unzureichend erforscht, auch im Hinblick auf ihre Empfänglichkeit für endemische Virusinfektionen.

Die Kuhpockenvirusinfektion, verursacht durch das Kuhpockenvirus (*Cowpox virus*), ist eine in Eurasien endemische, zoonotische Infektionskrankheit. Hierbei handelt es sich zumeist um sporadisch auftretende Erkrankungsfälle vor allem bei in Zoos und Zirkussen gehaltenen Tieren (Elefanten, Okapis, Großkatzen) oder bei Hauskatzen (ESSBAUER et al. 2010; KURTH und NITSCHKE 2012). Nach Ausrottung der Menschenpocken im Jahr 1980 und der damit verbundenen Einstellung der Pockenschutzimpfung, steigt der Anteil der für Orthopockenviren empfänglichen Menschen in der Bevölkerung (VOROU et al. 2008). Somit rückt auch die Kuhpockenvirusinfektion als Zoonose wieder in den Fokus der Öffentlichkeit. In den letzten 30 Jahren mehrten sich sowohl die Berichte über Erkrankungsfälle bei weiteren, hier heimischen Tierarten (z.B. Hunde und Pferde; PFEFFER et al. 1999, VON BOMHARD et al. 2011, FRANKE et al. 2016, JÄGER et al. 2016), als auch die Berichte über z. T. tödlich endende Kuhpockenvirusinfektionen beim Menschen, die sich durch Kontakt mit infizierten/erkrankten Haustieren (Ratten, Katzen) angesteckt hatten (WOLFS et al. 2002, CAMPE et al. 2009, NINOVE et al. 2009, VOGEL et al. 2012, GAZZANI et al. 2017, ZABA et al. 2017).

In den Jahren 2012 bis 2017 verzeichnete man im Patientengut der Klinik für Klauentiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig fünf Fälle von Kuhpockenvirusinfektion bei Alpakas aus vier Alpakabeständen in Ostdeutschland, von denen alle trotz intensivmedizinischer Betreuung tödlich endeten. Der Wert der Tiere und der resultierende wirtschaftliche Schaden bei Tierverlust, der enge Kontakt zum Menschen und die potenzielle Ansteckungsgefahr für Menschen und andere Tiere, begründete das Interesse, die Erkrankung beim Alpaka intensiver zu erforschen.

Die Ziele der vorliegenden Dissertationsschrift waren daher:

- Im ersten Teil der Arbeit auf der Basis einer Literaturrecherche einen Überblick über das Wesen der Kuhpockenvirusinfektion und ihre Relevanz bei Neuweltkameliden zu gewinnen.
- Im zweiten Abschnitt sollten anhand von Bestandsuntersuchungen in ostdeutschen Alpakabeständen Informationen zur Epidemiologie der Kuhpockenvirusinfektion mit Erregernachweis im Einzeltier, Erregerverbreitung in der Herde und Erregerreservoir gesammelt werden.

- Da aus Untersuchungen an anderen Spezies bekannt ist, dass eine prophylaktische Impfung mit dem Modifizierten Vaccinia Virus Ankara (MVA)-Impfstoff eine Möglichkeit der Prävention bietet, sollten im dritten Teil der Arbeit in zwei Alpakaherden mit dem Vorbericht – Kuhpockenvirusinfektion – eine Herdenimpfung mit diesem Impfstoff durchgeführt werden, um die Verträglichkeit und die Immunogenität des MVA-Impfstoffes beim Alpaka zu überprüfen.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Das Alpaka

#### 2.1.1 Zoologische Einordnung, Herkunft, Nutzung

Die Tierart Alpaka (*Vicugna pacos*) wird zoologisch in die Ordnung Paarhufer (Artiodactyla), die Unterordnung Schwielensohler (Tylopoda), die Familie Kamelartige (Camelidae) und die Gattung *Vicugna* eingeordnet. Diese Gattung umfasst zwei Tierarten, das Vicugna (*Vicugna vicugna*) und das Alpaka. Molekulargenetische Untersuchungen konnten nachweisen, dass das Alpaka als domestizierte Form aus der Tierart *Vicugna* hervorgeht (GAULY et al. 2011, GRUND 2014).

Alpakas stammen aus Südamerika und werden dort hauptsächlich in den Hochebenen der Anden (Peru, Bolivien, Argentinien, Chile) als Woll- und Fleischlieferanten sowie als Lastentiere gehalten (GAULY et al. 2011). Erst in den 1980er Jahren wurden sie nach Nordamerika, Australien, Neuseeland und Europa exportiert und seitdem dort erfolgreich gezüchtet (FOWLER und BRAVO 2010, GAULY et al. 2011). Ihre ursprüngliche Nutzung wird in unseren Breiten durch den Einsatz in der Landschaftspflege und tiergestützten Therapie erweitert oder die Tiere werden als Hobby- und Begleittiere gehalten (CARDETI et al. 2011, GAULY et al. 2011, HALSBY et al. 2017). Bezüglich der aktuellen Tierzahlen in Europa liegen keine genauen Angaben sondern nur Schätzungen vor. So soll es derzeit in Großbritannien etwa 35.000 Alpakas (HALSBY et al. 2017) und in Deutschland etwa 13.000 bis 20.000 Alpakas geben (BMEL 2013, NOZ 2018). Obwohl nach § 45 Viehverkehrsverordnung (ViehVerkV 2016) Halter von Kameliden in Deutschland dazu verpflichtet sind, ihren Bestand und die genaue Anzahl der Tiere der zuständigen Behörde anzuzeigen, werden vom Statistischen Bundesamt keine jährlichen Tierzahlen von Kameliden veröffentlicht.

#### 2.1.2 Haltung

Alpakas leben in Herdenverbänden bzw. Gruppen mit stabiler Rangordnung. Naturgegeben besteht eine Herde aus einem geschlechtsreifen Hengst – dem Leittier – und mehreren Stuten mit ihren Jungtieren. Weitere Hengste werden spätestens mit der Geschlechtsreife vom Leithengst unterworfen und aus der Herde vertrieben. Diese Tiere finden sich in Junghengstgruppen zusammen (GAULY et al. 2011, ADE 2015). Auf Grund dieser natürlichen Voraussetzungen haben sich für die Haltung von Alpakas als Hobby- oder Nutztieren verschiedene Gruppen- bzw. Herdenformen etabliert. Je nach Anzahl der Tiere im Bestand, kann neben der natürlichen Herdenform auch die geschlechtsspezifische Herdenform gewählt werden. Dabei werden Stuten und ihr Nachwuchs in Stutenherden gehalten, geschlechtsreife Hengste in Hengstgruppen abseits der Stutenherden und Junghengste in Junghengstherden. Durch Kastration können Hengste, die nicht zur Zucht vorgesehen sind, weiterhin in der natürlichen, gemischten Herde verbleiben (GAULY et al. 2011). Alpakas sind Distanztier, d.h.

sie halten einen Mindestabstand zu ihren Artgenossen ein und vermeiden wenn möglich direkten Körperkontakt (GAULY et al. 2011, ADE 2015). Sie betreiben untereinander keine gegenseitige Fellpflege. Diese wird durch Scheuern und Reiben an Gegenständen oder Sandbaden vollzogen (GAULY et al. 2011, BOYLE 2015). Die artgerechte Tierhaltung sieht bei Alpakas demnach ganzjährige Weide- oder Offenstallhaltung vor (GAULY et al. 2011).

### 2.1.3 Viruserkrankungen bei Neuweltkameliden in Europa

Im Vergleich zu in Europa heimischen Nutztierspezies Rind, Schaf, Ziege oder Schwein sind Viruserkrankungen bei Alpakas und Lamas aktuell noch wenig beschrieben. Der Zuwachs der Popularität der Neuweltkameliden in den letzten Jahrzehnten im europäischen Raum, hat auch zu einem Anstieg des wissenschaftlichen Interesses geführt. In Folge dessen lässt sich eine Zunahme an Fallberichten und experimentellen bzw. epidemiologischen Studien zu Viruserkrankungen erkennen, z.B. über Bovine Virus Diarrhoe (FOSTER et al. 2005, FOSTER et al. 2007, MUDRY et al. 2010), Bösartiges Katarrhalfieber (GOERIGK und MERBACH 2012, THEUSS et al. 2014), Borna'sche Erkrankung (JACOBSEN et al. 2010), Blauzungenerkrankung (ZANOLARI et al. 2010, SCHULZ et al. 2012), die Infektion mit dem Schmallenberg Virus (SCHULZ et al. 2015) oder mit dem Louping-III-Virus (MACALDOWIE et al. 2005, CRANWELL et al. 2008). Beschreibungen zur Kuhpockenvirusinfektion beschränkten sich bisher auf drei Fallberichte (SCHÜPPEL et al. 1997, CARDETI et al. 2011, GOERIGK et al. 2014).

## 2.2 Die Kuhpockenvirusinfektion

### 2.2.1 Ätiologie

Erreger der Kuhpockenvirusinfektion ist das Kuhpockenvirus (*Cowpox virus*; CPXV). Es ist endemisch in Europa und angrenzenden Gebieten Nord- und Zentralasiens (ESSBAUER et al. 2010, KURTH und NITSCHKE 2012) und gehört zum Genus Orthopockenviren (OPV) aus der Familie der Pockenviren (Poxviridae). Zu diesem Genus gehören 9 weitere Vertreter, wie z.B. das Vaccinia-Virus, das Variola-Virus, das Ectromelia-Virus oder das Affenpocken-Virus (ICTV 2018). Allen Vertretern ist gemein, dass sie serologisch kreuzreaktiv und kreuzprotektiv zueinander sind (ALZHANOVA und FRÜH 2010, MACLACHLAN et al. 2011, ROLLE und MAYR 2011).

OPV sind große DNA-Viren (220 – 450 × 140 – 260 nm) mit einer pleomorphen bis ziegelstein-ähnlichen Form (MACLACHLAN et al. 2011). Sie replizieren im Zytoplasma der Wirtszelle und bringen die dafür notwendigen Enzyme mit (ALZHANOVA und FRÜH 2010). Das Genom besteht aus einer linearen Doppelstrang-DNA mit ca. 186 – 230 Kbp (NITSCHKE 2010), wobei die CPXV innerhalb des Genus das größte Genom mit ca. 224 – 228 Kbp besitzen (ALZHANOVA und FRÜH 2010). Es werden darin ca. 200 Proteine kodiert. Der zentrale Teil des Genoms enthält konservierte Gene (ca. 90), welche

die essenziellen Funktionen der Virus-Replikation kodieren. In den terminalen Bereichen des Genoms finden sich variable Gene, welche in die Virus-Wirt-Interaktion involviert sind (ALZHANOVA und FRÜH 2010, NITSCHKE 2010). Diese umfassen sogenannte Virulenzgene (*virulence genes*) als auch Gene für das Wirtsspektrum (*host range genes*; MCFADDEN 2005, HALLER et al. 2014, OLIVEIRA et al. 2017). Die Anzahl dieser variablen Gene ist virusspezifisch innerhalb des Genus, wobei CPXV mit dem größten Genom auch die größte Bandbreite an variablen Genen enthalten (ALZHANOVA und FRÜH 2010, NITSCHKE 2010, OLIVEIRA et al. 2017, FRANKE 2018). Phylogenetische Analysen mittels Vollgenomsequenzierung haben ergeben, dass die Kuhpockenviren eine vielfältige, polyphyletische Gruppe darstellen. Diese lässt sich in mindestens vier unterschiedliche Kladen (VARV-like, VACV-like, CPXV-like 1 und CPXV-like 2) einteilen, eine fünfte Klade (CPXV-like 3) erscheint wahrscheinlich (CARROLL et al. 2011, FRANKE et al. 2017).

### 2.2.2 Wirtsspektrum und Erregerreservoir

CPXV besitzen ein sehr breites Wirtsspektrum (NITSCHKE 2010, HALLER et al. 2014, OLIVEIRA et al. 2017). Sie sind in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Säugerspezies inklusive des Menschen auf natürlichem Weg zu infizieren (ESSBAUER et al. 2010, NITSCHKE 2010, OLIVEIRA et al. 2017). Klinische Infektionen wurden bisher bei vielen Tierarten beschrieben. Diese umfassen sowohl in Europa heimische Tierarten, hauptsächlich Katzen aber auch Hunde und Pferde (PFEFFER et al. 1999, ESSBAUER et al. 2010, VON BOMHARD et al. 2011, FRANKE et al. 2016, JÄGER et al. 2016); und eine große Zahl an in Europa nicht heimischer – in Zoos und Zirkussen gehaltener – Arten. Dazu zählen u.a. Elefanten (KUNTZE 1974, PILASKI et al. 1995, WISSER et al. 2001, KNIERIEM 2002), Nashörner (SCHALLER und PILASKI 1979), Okapis (BASSE et al. 1964, ZWART et al. 1971), Ameisenbären und verschiedene Raubkatzen (MARENNIKOVA et al. 1977, BAXBY et al. 1982) als auch Neuweltaffen (MARTINA et al. 2006, KRAMSKI et al. 2010, CARDETI et al. 2017). Der Großteil der empfänglichen Spezies sind akzidentielle Wirte, sie infizieren sich durch direkten oder indirekten Kontakt mit Reservoirwirten (ESSBAUER et al. 2010, HOFFMANN et al. 2015, FRANKE 2018). Als Erregerreservoir dienen dem Virus kleine Nagetiere. Verschiedene serologische Studien in Europa identifizierten Wühlmäuse und Langschwanzmäuse als wahrscheinlichste Reservoirwirte (PILASKI und JACOBY 1993, CHANTREY et al. 1999, HAZEL et al. 2000, ESSBAUER et al. 2009, KINNUNEN et al. 2011, HOFFMANN et al. 2015); im Speziellen Rötelmäuse (*Myodes glaerolus*), Erdmäuse (*Microtus agrestis*), Feldmäuse (*Microtus arvalis*), Brandmäuse (*Apodemus agrarius*), Waldmäuse (*Apodemus sylvaticus*) und Gelbhalsmäuse (*Apodemus flavicollis*). Der direkte Virusnachweis inklusive Virusanzucht und -isolierung gelang bisher nur aus Feldmäusen (HOFFMANN et al. 2015, FRANKE et al. 2017), erst kürzlich konnte auch aus der Rötelmaus ein CPXV-Isolat gewonnen werden (JESKE et al. 2019).

Der Mensch infiziert sich durch direkten Kontakt zu infizierten Tierarten (akzidentielle Wirte), am häufigsten von infizierten Katzen (BAXBY et al. 1994, GAZZANI et al. 2017), es wurden aber auch Übertragungen von Ratten und Zootieren beschrieben (KURTH et al. 2008, CAMPE et al. 2009, KURTH et al. 2009, NINOVE et al. 2009). Auf Grund der Übertragungsmöglichkeit auf den Menschen wird die CPXV-Infektion als Zoonose eingestuft. Sie ist in Deutschland nach der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten für Einhufer, Rinder, Schweine, Ziegen, Katzen, Hasen und Kaninchen meldepflichtig (Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten 2015). In den Jahren 2013 bis 2017 wurden in Deutschland 77 Fälle von Orthopockeninfektionen gemeldet (FLI 2018).

### 2.2.3 Diagnostik

Verschiedene Nachweismethoden haben sich heute für den direkten Erregernachweis und den Nachweis von OPV-spezifischen Antikörpern etabliert. Der direkte Erregernachweis hat den Anspruch, schnell und sensitiv zu sein, weswegen heute die Elektronenmikroskopie oder die real-time Polymerase – Kettenreaktion (PCR) bzw. beide Verfahren kombiniert zum Einsatz kommen (ESSBAUER et al. 2004, KURTH und NITSCHKE 2011). Bei der real-time PCR werden heute Genus-spezifische und Spezies-spezifische Amplifikationsschritte kombiniert, sodass eine gleichzeitig differenzierende Diagnostik für OPV und CPXV möglich ist (MAKSYUTOV et al. 2015, FRANKE 2018). Bei positivem PCR-Ergebnis wird in den meisten Fällen eine Virusanzucht in der Zellkultur (z.B. auf Verozellen) eingeleitet, um danach eine Vollgenomsequenzierung mittels *next generation sequencing* durchzuführen (FRANKE 2018). Geeignetes Probenmaterial umfasst Vesikelflüssigkeit, Krustenmaterial, Abstriche von Haut- und Schleimhautläsionen, Hautgeschabsel, Haut- und Organbiopsien als auch eine bronchioalveoläre Lavage (ESSBAUER et al. 2004; KURTH und NITSCHKE 2011). Der indirekte Nachweis kommt zumeist retrospektiv in epidemiologischen Studien zur Anwendung. Hierbei werden OPV-spezifische Antikörper aus dem Serum bestimmt. Es haben sich dafür der ELISA, der Immunfluoreszenztest oder der Plaquereduktionstest bewährt. Da alle Vertreter der OPV kreuzreaktiv sind, erlaubt der indirekte Nachweis keinen Speziesnachweis. Zur Feststellung einer akuten Infektion allein über den Antikörpernachweis ist die Entnahme von zwei im Abstand von 10–14 Tagen gewonnenen Serumproben essenziell, bei denen im Ergebnis ein deutlicher Titer-Anstieg erkennbar ist (ESSBAUER et al. 2004, NITSCHKE 2010, KURTH und NITSCHKE 2011).

### 2.2.4 Klinisches Erscheinungsbild

Die CPXV-Infektion äußert sich als zyklische Allgemeininfektion mit pockenartigen Effloreszenzen der Haut oder Schleimhäute, welche die klassischen Stadien Makula, Papel, Vesikel und Pustel durchlaufen. Die Pusteln eröffnen sich oder trocknen ein und bilden eine Kruste, welche abfällt und eine Narbe hinterlässt. Diese Haut- und Schleimhautläsionen – fokal, multifokal oder diffus auftretend – sind zumeist im Kopfbereich, an den distalen Gliedmaßen, am Euter und im Bereich des Perineums

lokalisiert (ROLLE und MAYR 2011). Es werden ein milder, lokalisierter, zu meist selbstlimitierender Verlauf und ein generalisierter, zumeist tödlicher Verlauf mit Virusvermehrung in den inneren Organen beschrieben. (MAYR und CZERNY 1990, ESSBAUER et al. 2010, GOERIGK et al. 2014). Die meisten Berichte liegen für Katzen vor, bei denen der milde Verlauf dominiert und sich oft als einzelne schlecht heilende Hautwunden an Kopf, Hals und Vorderpfoten äußert (ESSBAUER et al. 2010). Wenige generalisierte Verläufe mit respiratorischen Symptomen wie Augen- und Nasenausfluss, Husten und Dyspnoe wurden beschrieben (HINRICHS et al. 1999, MCINERNEY et al. 2016). Beschreibungen bei Zootieren dagegen berichten sehr häufig von schweren generalisierten Verläufen, die tödlich enden (ESSBAUER et al. 2010). Eine detaillierte tierartenübergreifende Beschreibung des klinischen Erscheinungsbildes erfolgt in Publikation 1 als Literaturübersicht, weswegen an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen wird.

#### 2.2.5 Differentialdiagnosen

Bei Hautveränderungen sollten differentialdiagnostisch Dermatomykosen, bakterielle Infektionen, Milbeninfektionen (Räude), als auch Verbrennungen oder Verätzungen in Betracht gezogen werden und ggf. über weitere Diagnostik ausgeschlossen werden (GOERIGK et al. 2014). Bei Veränderungen im Kopfbereich, besonders hinsichtlich umschriebener Läsionen im Bereich der Augen, Nasenschleimhaut oder Maulschleimhaut bzw. Zunge sind Erkrankungen wie Stomatitis vesicularis, die Blauzungenerkrankung, Maul- und Klauenseuche, Bovine Virus Diarrhoe, Lippengrind als auch Bösartiges Katarrhalfieber als Differentialdiagnosen zu bedenken (MAYR und CZERNY 1990, GOERIGK et al. 2014).

#### 2.2.6 Therapie/Prophylaxe

Als antivirale Chemotherapeutika gegen OPV-Infektionen sind die Wirkstoffe Cidofovir (ein azyklisches Nukleosidphosphat), Brincidofovir (CMX001; ein Lipid-konjugiertes Derivat von Cidofovir) und Tecovirimat (ST-246; ein *small molecule compound*) bekannt (NITSCHKE 2010, SMEE 2013). Da keiner der Wirkstoffe in der Europäischen Union für die Veterinärmedizin zugelassen ist (EMA 2019), gibt es bisher, außer den Beschreibungen aus experimentellen Studien (ROY et al 2003, QUENELLE und KERN 2010, SMEE 2013), auch keine Beschreibungen über die Anwendung bei natürlich CPXV-erkrankten Tieren.

Um einer CPXV-Infektion vorzubeugen, hat sich die prophylaktische Impfung mit dem Modifizierten Vaccinia Virus Ankara (MVA)-Impfstoff bewährt. Sie wurde sowohl für Elefanten, Mäuse, Katzen, Kaninchen als auch verschiedene Zootiere beschrieben (LAUER 1993, MUNZ 1993, MAHNEL und MAYR 1994, KURTH et al. 2009, CARDETI et al. 2017) und hat sich sowohl bei Tieren als auch beim Menschen als effektiv und sicher bewährt (MAHNEL und MAYR 1994).

## 2.3 Der MVA-Impfstoff

Die Eigenschaft der serologischen Kreuzreaktivität und -protektivität der Vertreter der OPV wird genutzt, wenn es um prophylaktische Impfung gegen OPV-Infektionen geht. Erfolgreichstes Beispiel war die World Health Organisation-koordinierte Impfkampagne zur Ausrottung der Menschenpocken (ausgelöst durch das Variola-Virus) durch Impfung mit verschiedenen Vaccinia-Virusstämmen. Diese Lebendimpfstoffe der 1. und 2. Generation waren erfolgreich immunogen, konnten jedoch auch selten ernsthafte Impfkomplicationen auslösen. Gegen Ende der Impfkampagne wurden daher attenuierte Impfstoffe entwickelt, um ernsthafte Impfkomplicationen entgegenzuwirken (MEYER 2013).

Anton Mayr und Kollegen entwickelten den attenuierten Stamm MVA aus einem virulenten Dermovakzine-Stamm vom Esel mit der Bezeichnung ‚Chorioallantois Vaccinia Virus Ankara‘ (CVA; MAYR et al. 1975, MAHNEL und MAYR 1994). Das über 500-malige Passagieren von CVA auf Hühnerembryofibroblasten-Zellkulturen führte zu 6 Deletionen in den terminalen Fragmenten und zu einer Reduktion der Gesamtlänge des Genoms von 208 auf 178 kilo-Basenpaare. Diese Attenuierungen betreffen Gene des Wirtsspektrums und Gene für die Bildung der Typ-A-Einschlusskörperchen. In der Folge kommt es zur Minimierung des Wirtsspektrums, zur Unfähigkeit Replikationszyklen in den meisten Säugerzellen zu vollenden, bei unverminderter Fähigkeit zur Stimulation der humoralen Abwehr z.B. durch Induktion von Interferon alpha (MAYR et al. 1975, MAHNEL und MAYR 1994). Diese Eigenschaften ermöglichen den Einsatz von MVA als sehr gut verträglichen und sicheren Impfstoff gegen OPV-Infektionen bei Menschen und Tieren (MAYR et al. 1975, MAHNEL und MAYR 1994), als Paraimmunitätsinducer (VILSMEIER 1999) und auch als Vektorvakzine (GILBERT 2013; VOLZ und SUTTER 2017).

## 2.4 Schlussfolgerung aus der Literaturrecherche und Zielstellung

Das Vorkommen von CPXV beschränkt sich bisher auf Europa und angrenzende Gebiete Nord- und Zentralasiens (ESSBAUER et al. 2010, KURTH und NITSCHKE 2012). Wildlebende Nagetierspezies dienen dem Virus als Erregerreservoir. Ergebnisse aus aktuellen Studien grenzen es derzeit auf die Spezies Feldmaus und Rötelmaus ein (FRANKE 2018, JESKE et al. 2019). Das breite Wirtsspektrum von CPXV führte bisher zu Erkrankungen in zahlreichen Säugetierspezies als auch beim Menschen (ESSBAUER et al. 2010, OLIVEIRA et al. 2017), welcher sich zumeist durch Kontakt zu infizierten/erkrankten Tieren infiziert. Sorge bereitet in diesem Zusammenhang vor allem die Tatsache, dass ein immer größerer Anteil der Bevölkerung keinen Impfschutz gegen OPV mehr besitzt und somit für diese zoonotischen Virusinfektionen voll empfänglich ist (VOROU et al. 2008, ESSBAUER et al. 2010). Auch wenn sich die Erkrankung im immunkompetenten Individuum meist lokal begrenzt und mit mildem Verlauf äußert, sind vermehrt Beschreibungen zu generalisierten Fällen mit z.T. tödlichem Ausgang im zumeist immunsupprimierten Individuum sowohl für Tiere als auch für den Menschen zu finden (VOROU et al.

2008, ESSBAUER et al. 2010, NITSCHKE 2010). Nach derzeitigem Stand sind in Europa/Deutschland weder für die Human- noch für die Veterinärmedizin geeignete Wirkstoffe für eine kausale Therapie dieser Infektion zugelassen (EMA 2019), einzige Möglichkeit der Prävention dieser Erkrankung ist die prophylaktische Impfung, wofür sich der MVA-Impfstoff sehr gut eignet (MAHNEL und MAYR 1994). Für Alpakas und Lamas sind bis jetzt nur drei Berichte zu dieser Infektion veröffentlicht (SCHÜPPEL et al. 1997, CARDETI et al. 2011, GOERIGK et al. 2014). Die Tierart Alpaka ist erst seit circa 40 Jahren in Deutschland und Europa heimisch (FOWLER und BRAVO 2010, GAULY et al. 2011), wissenschaftliche Erkenntnisse bezüglich ihrer Empfänglichkeit für in Europa und Deutschland endemische Erkrankungen werden in steigender Anzahl veröffentlicht (siehe Punkt 2.1.3). Nach Ansicht der Autorin muss man dennoch davon ausgehen, dass zu dieser Tierart weiterhin großer Forschungsbedarf besteht. Die steigende Popularität von Alpakas als Hobby-, landwirtschaftliche Nutztiere und vor allem als Tiere in der tiergestützten Therapie mit häufigem Menschenkontakt sowie vier unabhängige Cluster von CPXV-Infektionen bei Alpakas in einem Zeitraum von nur fünf Jahren, begründeten das Interesse, diese Infektion bei dieser Tierart genauer zu untersuchen. Die Ziele der vorliegenden Dissertationsschrift waren daher, auf der Basis einer Literaturrecherche einen Überblick über das Wesen der Kuhpockenvirusinfektion und ihre Relevanz bei Neuweltkameliden zu gewinnen (Publikation 1). Weiterhin sollten anhand von Bestandsuntersuchungen in ostdeutschen Alpakabeständen Informationen zur Epidemiologie der Kuhpockenvirusinfektion mit Erregernachweis im Einzeltier, Erregerverbreitung in der Herde und Erregerreservoir gesammelt werden (Publikation 2). Da aus Untersuchungen an anderen Spezies bekannt ist, dass eine prophylaktische Impfung mit dem MVA-Impfstoff eine Möglichkeit der Prävention bietet, sollten im dritten Teil der Arbeit in zwei Alpakaherden mit dem Vorbericht – Kuhpockenvirusinfektion – eine Herdenimpfung mit diesem Impfstoff durchgeführt werden, um die Verträglichkeit und die Immunogenität des MVA-Impfstoffes beim Alpaka zu überprüfen (Publikation 3).

Folgende Arbeitshypothesen liegen der Studie zu Grunde:

1. Die Infektion mit dem Kuhpockenvirus zeigt sich klinisch beim Alpaka in zwei unterschiedlichen Verlaufsformen (Publikation 1 und Publikation 2).
2. CPXV wird über eine externe Infektionsquelle in den Alpakabestand eingetragen. Erregerreservoir sind wildlebende Nagetiere (Publikation 2).
3. Das Virus wird innerhalb der Herde durch direkten Tierkontakt von Tier zu Tier übertragen (Publikation 2).
4. Der MVA-Impfstoff ist beim Alpaka sehr gut verträglich (Publikation 3).

5. Die MVA-Impfung löst spätestens nach zweimaliger Grundimmunisierung im Abstand von vier Wochen eine Immunantwort in Form von messbaren Antikörpertitern aus, welche im Verlauf eines Jahres nach Grundimmunisierung weiterhin messbar sind (Publikation 3).
6. Bei neugeborenen Crias von geimpften Mutterstuten sind maternale Antikörper nach der Geburt messbar (Publikation 3).



### **3 Publikation 1**

#### **Klinisches Erscheinungsbild der Kuhpockenvirusinfektion bei Neuweltkameliden – Eine Übersicht**

Almut Prkno, Matthias Kaiser, Daniela Goerigk, Martin Pfeffer, Thomas W. Vahlenkamp, Donata Hoffmann, Martin Beer, Alexander Starke

Tierärztl Prax. 2018;46(G)(01):50–56

DOI: 10.15653/TPG-170502

Almut Prkno entwickelte das Konzept für diese Literaturübersicht unter wissenschaftlicher Beratung von Alexander Starke. Sie war für die Begutachtung der einbezogenen Literatur verantwortlich. Sie führte die Aufbereitung und Auswertung der gewonnenen Fakten unter wissenschaftlicher Beratung der genannten Koautoren durch und erstellte das Manuskript für diese Publikation.

## **Klinisches Erscheinungsbild der Kuhpockenvirusinfektion bei Neuweltkameliden – Eine Übersicht**

Almut Prkno<sup>1</sup>, Matthias Kaiser<sup>1</sup>, Daniela Goerigk<sup>2</sup>, Martin Pfeffer<sup>3</sup>, Thomas W. Vahlenkamp<sup>4</sup>, Donata Hoffmann<sup>5</sup>, Martin Beer<sup>5</sup>, Alexander Starke<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinik für Klauentiere, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

<sup>2</sup> Tierarztpraxis Dr. Daniela Goerigk, Naundorfer Str. 9, 04668 Schkortitz

<sup>3</sup> Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

<sup>4</sup> Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

<sup>5</sup> Institut für Virusdiagnostik, Friedrich-Loeffler-Institut, Riems

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Alexander Starke

Klinik für Klauentiere

Veterinärmedizinische Fakultät

der Universität Leipzig

An den Tierkliniken 11

04103 Leipzig

E-Mail: [alexander.starke@vetmed.uni-leipzig.de](mailto:alexander.starke@vetmed.uni-leipzig.de)

## **Zusammenfassung**

Die Infektion mit Kuhpockenvirus (Cowpox virus; CPXV) ist eine sporadisch auftretende, meldepflichtige Erkrankung mit zoonotischem Potential. Sie wurde in den letzten sechs Jahrzehnten sowohl bei Haustieren (Katze, Hund, Pferd, Rind) als auch bei Zootieren (z.B. Elefant, Nashorn, Okapi) in größerem Umfang beschrieben und erforscht. Dagegen finden sich in der Literatur nur drei Fallberichte über diese Infektion bei Neuweltkameliden (NWK). Ziel dieser Übersichtsarbeit war, den aktuellen Kenntnisstand zum klinischen Erscheinungsbild der CPXV-Infektion bei NWK zusammenfassend darzustellen und mit dem bei anderen Tierarten zu vergleichen. Auch bei Alpaka und Lama erfolgt die Übertragung des Virus bei direktem Tierkontakt oder durch orale Virusaufnahme, wobei Mikroläsionen der Haut oder Schleimhaut als Eintrittspforten für das Virus fungieren. Klinisch kann ein lokal begrenzter, milder Verlauf mit Pusteln oder Krusten der Haut, die auf einzelne Körperbereiche (Kopf, Hals, Gliedmaßen, Perinealbereich) beschränkt bleiben, beobachtet werden. Dem gegenüber steht ein generalisierter, meist letaler Infektionsverlauf mit multifokal bis diffus verteilten Hautläsionen (Papeln, Pusteln, Krusten, ulzerierende Wunden) und Virusreplikation in weiteren Organen. Die Tiere entwickeln unter anderem Konjunktivitis, Stomatitis und Rhinitis gepaart mit unspezifischen Symptomen wie Inappetenz, Apathie und Fieber. Die klinische Manifestation scheint wie bei anderen Pockenvirusinfektionen durch Faktoren, die das Immunsystem schwächen, begünstigt zu werden. Bisher gibt es jedoch keinen Hinweis auf NWK-spezifische Besonderheiten in Bezug auf das klinische Erscheinungsbild der CPXV-Infektion. In Hinblick auf das Verständnis der Pathogenese und Epidemiologie dieser Erkrankung, speziell bei NWK, eröffnet sich Raum für weitere Forschung.

Schlüsselwörter: Orthopoxviren, CPXV, Zoonose, Alpaka, Lama

## Summary

Cowpox virus (CPXV) infection is a reportable and potentially zoonotic disease that occurs sporadically in a variety of animals. In the past six decades, CPXV infection has been extensively researched and described in both domestic animals (cat, dog, horse, cattle) and zoo animals (e.g. elephant, rhinoceros, okapi). Of note, a review of the literature produced only three reports of CPXV in individual or small groups of South American camelids. The goal of this review was to describe the current knowledge as it relates to clinical features of CPXV infection in South American camelids and to compare the clinical manifestations with those described in other animal species. In alpacas and llamas, virus transmission occurs via direct contact with infected animals or oronasal infection through microlesions in the skin and mucous membranes. In its mild form, the disease is limited to certain regions of the body (head, neck, extremities or perineal region) and characterised by pustules or crusts. CPXV infection can also cause generalised and frequently lethal disease with multifocal to diffuse skin lesions (papules, pustules, crusts, ulcers) accompanied by virus replication in other organs. Conjunctivitis, stomatitis and rhinitis are seen commonly together with nonspecific clinical signs, including anorexia, listlessness and fever. As in other poxvirus infections, factors leading to an immunosuppression may contribute to the development of the clinical manifestation of CPXV infection. There appear to be no specific manifestations of CPXV infection in South American camelids. More research is needed to fully understand the pathogenesis and epidemiology of CPXV infection, particularly in South American camelids.

Keywords: Orthopoxvirus, CPXV, zoonosis, alpaca, llama

## 1. Einleitung

Die Infektion mit dem Kuhpockenvirus (cowpox virus; CPXV) stellt bei den meisten Tierarten eine sporadisch auftretende Erkrankung dar (13, 52). Der Erreger, ein DNA-Virus aus der Familie *Poxviridae* und dem Genus *Orthopoxvirus*, ist in Europa und angrenzenden Gebieten Nord- und Zentralasiens verbreitet (7, 54). Als Erregerreservoir gelten wildlebende Nager wie Rötelmaus, Waldmaus und Feldmaus (11, 15, 24, 54). In den letzten 60 Jahren wurden zahlreiche Fallberichte zu dieser Infektion veröffentlicht. Es finden sich Beschreibungen sowohl bei in Deutschland heimischen Tierarten, wie Rind (20, 56), Katze (21, 38, 41), Hund (7, 25) oder Pferd (14, 43), als auch eine große Anzahl an Fallberichten bei in Deutschland nicht heimischen, in Zoos und Zirkussen gehaltenen Tierarten, wie z.B. Okapis, Elefanten, Nashörnern, Löwen, Geparden, Pumas, Affen und einigen mehr (13, 33, 44).

Die CPXV-Infektion ist eine Zoonose (13, 54) und in Deutschland nach der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten für Einhufer, Rinder, Schweine, Ziegen, Katzen, Hasen und Kaninchen meldepflichtig (53). Die Übertragung von Tier zu Mensch erfolgt über direkten Kontakt oder Bisse. Nicht selten sind es Infektionen bei Hauskatzen oder als Heimtiere gehaltenen Ratten (z.B. Farbratten), die als Ursache für humane CPXV-Infektionen angesehen werden können (12, 15, 18, 54). Der Großteil der Infektionen bleibt bei immunkompetenten Personen auf lokale Hautläsionen im Gesicht oder an den Händen begrenzt. Infolge einer Immunsuppression kann es auch beim Menschen zu generalisierten Infektionen kommen (12, 18, 54).

Zu den Neuweltkameliden (NWK) gehören neben den domestizierten Lamas (*Lama glama*) und Alpakas (*Vicugna pacos*) auch die in Teilen Südamerikas wildlebenden Vikunjas (*Vicugna vicugna*) und Guanakos (*Lama guanicoe*). Die aus den Hochebenen der Anden Südamerikas stammenden Lamas und Alpakas wurden vor ca. 40 Jahren nach Nordamerika, Australien und Europa eingeführt und dort gezüchtet (17). Ihre ursprüngliche Nutzung als Lastentiere, Wolllieferanten und Fleischproduzenten (17) wird in unseren Breiten mittlerweile durch den Einsatz in der tiergestützten Pädagogik und Therapie sowie in der Landschaftspflege erweitert (9). Ein großer Teil dieser NWK wird auch als Begleit- oder Freizeittier gehalten (10, 17, 23). Nach Auffassung der Autoren sind es vor allem die Nutzung in der tiergestützten Pädagogik und Therapie, der Einsatz als Lastentier bei Treckingtouren oder die einfache Hobbyhaltung, die engen Kontakt der Tiere zu Menschen aller Altersgruppen mit sich bringen, woraus sich ein erhöhtes Risiko für eine Übertragung von Zoonoseerregern ergibt.

Obwohl die NWK-Population in Mitteleuropa weiter zunimmt, beschränkt sich die aktuell verfügbare Literatur zur CPXV-Infektion bei dieser Spezies (Pubmed Recherche „cowpox virus llama alpaca“ vom 13.04.2017) auf einzelne Fallberichte (10, 22, 47). Da jeweils nur ein Tier oder eine kleine Gruppe von

Tieren beschrieben wird, ist nicht eindeutig ersichtlich, welche unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen diese Infektion bei NWK annehmen kann.

In diesem Artikel wird das klinische Bild der CPXV-Infektion bei NWK genauer beschrieben und der aktuelle Kenntnisstand zu unterschiedlichen Verlaufsformen inklusive eventueller tierartspezifischer Besonderheiten zusammenfassend dargestellt.

## **2. Kuhpockenvirusinfektion tierartübergreifend im Überblick**

### **2.1 Übertragung und Infektionsweg**

Der Hauptübertragungsweg für CPXV ist der direkte Tierkontakt. Das Virus wird dabei z.B. über Hautkrusten (Wundabschürfungen), Augen- und Nasensekret oder Speichel weitergegeben (5, 31, 34). Die Virusaufnahme erfolgt über kontaminiertes Futter sowohl bei Karnivoren (z.B. Hauskatze, Raubkatzen), die infizierte Beutetiere fressen, als auch bei Herbivoren (z.B. Elefanten, Pferde), die mit infiziertem Nagerkot oder -urin kontaminiertes Gras, Heu und Stroh aufnehmen (14, 36, 45). Dabei dringt das Virus über Haut- oder Schleimhautläsionen in den Organismus ein. Auch die intrauterine Übertragung ist möglich (14, 40, 55).

An der Eintrittspforte (Haut- oder Schleimhautläsionen) kommt es zur Infektion primärer Zielorgane, wie z.B. der Epidermis der Haut und des Epithels der Nasen- oder Maulschleimhaut (6, 39, 42). Hier findet die erste Virusvermehrung statt. Vom Ort der Erstinfektion breitet sich das Virus lymphogen, vermutlich als freies Virus oder an Makrophagen gebunden, in die regionalen Lymphknoten aus (8, 39), von wo es lymphogen und hämatogen (erste Virämie) weitere lymphatische Organe (Milz, Leber, Knochenmark, andere Lymphknoten) erreicht. Nach erneuter Replikation nutzt das Virus die Blutbahn, um sich in einer zweiten Virämie auszubreiten und weitere Organe zu infizieren (39, 51).

Wie weit und wie intensiv sich das Virus im Wirtsorganismus ausbreiten kann, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zum einen sind die individuelle Konstitution des Wirtes und die Kompetenz seines Immunsystems von großer Bedeutung. Als nachteilig für den Wirt müssen jede Schwächung des Immunsystems durch Suppression oder Vor- bzw. Begleiterkrankungen angesehen werden (1, 8). Bedeutung haben ferner die Virulenz des Virusstamms, die Infektionsdosis sowie die Infektionsroute (8, 39, 41). Verschiedene Infektionsversuche bei Mäusen, Ratten, Katzen und Affen belegen, dass es in Abhängigkeit von Infektionsroute/-dosis und Eigenschaften des Virusstammes unterschiedliche klinische Manifestationen und Krankheitsverläufe gibt (5, 8, 26–28, 31, 39, 49, 50, 57).

## 2.2 Klinische Symptome und Verlaufsformen

Aus zahlreichen Fallberichten zur CPXV-Infektion bei unterschiedlichen Tierarten können die klinischen Symptome dieser Erkrankung wie folgt zusammengefasst werden:

Im Vordergrund stehen die Veränderungen der Haut. Nach einer Inkubationszeit von 3 – 7 Tagen (40, 42) zeigen sich eine oder einige wenige Primärläsion(en), häufig im Bereich des Kopfes oder der Gliedmaßen. Nach einigen weiteren Tagen, manchmal auch erst nach 1 – 2 Wochen (je nach Tierart), können zusätzlich multifokal oder diffus über die ganze Körperoberfläche verteilt Sekundärläsionen auftreten. Sowohl Primär- als auch Sekundärläsionen werden als runde, gut abgegrenzte Hautveränderungen (je nach Tierart 0,2 – 2 cm im Durchmesser) beschrieben. Diese treten als Makulae, erhabene Papeln, Vesikel und Pusteln in Erscheinung und verkrusten später oder bilden kraterartige, zentral ulzerierende Wunden (1, 8, 16, 19, 25, 36, 38, 58). In den drainierenden Lymphknoten kommt es insbesondere beim Menschen häufig zu einer sehr schmerzhaften Lymphangiopathie mit entsprechenden Bewegungseinschränkungen (54).

Umschriebene Läsionen werden auch im Bereich der Maulschleimhaut, des Zahnfleisches und der Zunge sowie im Rachen beschrieben. Sie haben meist vesikulären oder erosiven bis ulzerativen Charakter und können ähnlich der Hautläsionen fokal oder multifokal verteilt sein. Nicht selten führen sie zu einer Steigerung des Speichelflusses, zu Schluckbeschwerden und reduzierter Futteraufnahme (2, 19, 21, 37, 58). Betont respiratorische Symptome wie keuchender Husten, Maulatmung, Würgen, Schniefen, Dyspnoe, Tachypnoe oder Verschärfung der inspiratorischen Atemgeräusche lassen sich ebenfalls der CPXV-Infektion zuordnen (2, 8, 36, 41).

Als begleitende unspezifische Symptome treten gestörtes Allgemeinbefinden, Fieber, Inappetenz, Erbrechen und Durchfall auf (1, 16, 36, 58). Sowohl Augen- und Nasenausfluss von unterschiedlicher Art (serös, mukös, mukopurulent, purulent), als auch ein- oder beidseitige Konjunktivitis werden entweder im Anfangsstadium oder zusätzlich zu den Hautläsionen beschrieben (1, 2, 8, 19, 46, 58). In Verbindung mit Hautläsionen im Kopfbereich oder an den Gliedmaßen werden in wenigen Beschreibungen auch ödematöse Schwellungen der Haut und des umliegenden Weichteilgewebes erwähnt (1, 16, 21, 45). Bei Elefanten und Nashörnern führte eine CPXV-Infektion zu Hornveränderungen an einer oder mehreren Gliedmaßen mit Unterminierung des Sohlenhorns führen, was im schlimmsten Fall die Exungulation (Ausschuhen) zur Folge hatte (32, 45, 46).

Die Ausprägung verschiedener Verlaufsformen kann ebenso tierartenübergreifend nachvollzogen werden. Nach heutigem Kenntnisstand zur Pathogenese der CPXV-Infektion und zu den beschriebenen Einflussfaktoren erscheint nach Auffassung der Autoren eine Unterteilung in Verlaufsformen sinnvoll, wie von Mayr und Czerny (40) für die CPXV-Infektion bei Wiederkäuern dargestellt. Demnach gibt es

eine lokal begrenzte Verlaufsform mit pustulösen Hautläsionen, die zumeist gutartig verläuft. Dem gegenüber steht eine generalisierte Verlaufsform, die sich als systemische Infektionskrankheit zyklischer Natur mit generalisierter Pockenmanifestation auf Haut, Schleimhäuten und inneren Organen darstellt und häufig einen schweren, zum Teil auch tödlichen Verlauf nimmt (40). Ähnliches, nur nicht explizit als verschiedene Verlaufsformen benannt, geht aus Studien bei der Katze hervor (1, 4). Bei in Zoos gehaltenen Vertretern der Familie Felidae wird von einer schweren pulmonalen, einer mild bis schweren dermalen, einer schweren gemischten pulmonal-dermalen sowie einer asymptomatischen Verlaufsform berichtet (3, 36). Hier liegt der Fokus der Betrachtung auf der Manifestation der klinischen Symptome in verschiedenen Organsystemen. Dennoch lässt sich auch bei dieser Einteilung ein eher lokal begrenzter Verlauf von einem generalisierten Verlauf unterscheiden.

### **3. Die Kuhpockenvirusinfektion bei Neuweltkameliden**

Die CPXV-Infektion scheint bei NWK erst in den letzten 20 Jahren bekannt geworden zu sein, zumindest liegen erst seit 1997 Fallberichte dazu vor. Die Beschreibungen stammen ausschließlich aus dem europäischen Raum (Deutschland, Italien) und beziehen sich auf Alpakas und Lamas (10, 22, 47), für Guanakos und Vikunjas ließen sich keine Veröffentlichungen finden. Daher beschränken sich die weiteren Ausführungen ausschließlich auf Alpakas und Lamas.

#### **3.1 Übertragung und Infektionsweg**

Da bei NWK bisher keine Infektionsversuche mit CPXV oder epidemiologische Studien zur CPXV-Infektion bekannt sind, werden hinsichtlich Übertragung und Infektionsweg im Analogieschluss zu CPXV-Infektionen bei anderen Tierarten die gleichen Gegebenheiten vermutet. Aufgrund der ganzjährigen Weidehaltung von NWK in Herden und des möglichen Kontakts zu wildlebenden Nagern ist auch bei Lamas und Alpakas der direkte Tierkontakt als Hauptübertragungsweg und ebenso eine Infektion durch Aufnahme von mit Nagerkot oder -urin kontaminiertem Futter wahrscheinlich (22, 47). Nachweise des CPXV in Hautläsionen (10, 22, 47), Mandibularlymphknoten und Lunge (22) lassen darauf schließen, dass auch bei NWK Haut- und Schleimhautläsionen Eintrittspforte für das Virus sind und die lymphogene Ausbreitung in regionale Lymphknoten sowie in andere Organe stattfindet.

#### **3.2 Klinische Symptome und Verlaufsformen**

Den drei publizierten Fallberichten ist zu entnehmen, dass die CPXV-Infektion sowohl bei Alpakas als auch bei Lamas in Hinblick auf Schweregrad der Infektion und Ausprägung der klinischen Symptome verschiedene Verlaufsformen annehmen kann (10, 22, 47). Eine Verlaufsform äußert sich als lokal begrenztes Hautexanthem mit Hautläsionen, die entweder ausschließlich im Kopfbereich (Augenlider, Nase, Lippen, Ohren, Maul) oder im Kopfbereich, an den Zitzen und am Anus parallel auftreten (Abb. 1). Diese Hautläsionen präsentieren sich als Pusteln, die sich zu krustigen Veränderungen mit zum Teil



kraterförmiger Morphologie entwickeln können. Sie heilen innerhalb von 3 Wochen ab, ohne dass andere Symptome zu erkennen sind oder das Allgemeinbefinden der Tiere gestört ist (10, 47).

Bei der zweiten Verlaufsform handelt es sich um eine systemische Infektionskrankheit mit generalisiertem Exanthem, gestörtem Allgemeinbefinden und erhöhter Körpertemperatur. Futter- und Wasseraufnahme sind reduziert und können je nach Schweregrad der Infektion in Anorexie übergehen. Hauteffloreszenzen (Papeln, Pusteln, Krusten), die sich anfänglich im Kopfbereich entwickeln, breiten sich innerhalb weniger Tage über die ganze Körperoberfläche aus. Weiterhin bestehen deutliche Veränderungen an den Schleimhäuten im Kopfbereich: So kann eine mukopurulente Konjunktivitis mit zentraler milchiger Trübung der Kornea oder eine hämorrhagisch-purulente Keratokonjunktivitis (Abb. 2) feststellbar sein, die mit Schwellung der Augenlider und Verklebungen der Lidspalten einhergehen kann. Ferner zeigen die Tiere mukösen bis mukopurulenten Nasenausfluss. Auf der Maulschleimhaut finden sich oft multiple kreisrunde Erosionen und Ulzerationen, die eine starke Salivation auslösen können. Die Auskultation des Abdomens ergibt eine reduzierte Motorik des ersten Vormagenkompartiments. Eine auftretende hochgradige Lahmheit einzelner Gliedmaßen kann durch Schwellung und Schmerzhaftigkeit einzelner Gelenke (z.B. Fesselgelenk), durch Hautläsionen im Bereich der Gelenke und Schwellung des umliegenden Weichteilgewebes oder durch eine Tendovaginitis verursacht sein. Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es zu einer deutlichen Verschlechterung des Allgemeinzustandes bis hin zu Depression, Lethargie und Festliegen, sodass die Tiere versterben oder euthanasiert werden müssen (10, 22, 47).

Das Vorkommen einer dritten, nahezu oder völlig symptomlosen Verlaufsform ist sehr wahrscheinlich. Solche Infektionsverläufe lassen sich in betroffenen Beständen anhand von serologischen Untersuchungen nachweisen (10, 22).

#### **4. Diskussion**

Obwohl sich Publikationen zur CPXV-Infektion bei NWK auf die drei oben zitierten Fallberichte beschränken, lässt sich feststellen, dass fast alle bei Lama und Alpaka auftretenden klinischen Symptome bei anderen Tierarten in ähnlicher Weise beschrieben wurden. Genannt seien das pockentypische Exanthem (lokal begrenzt oder generalisiert), die meisten Veränderungen der Schleimhäute im Kopfbereich oder begleitende unspezifische Symptome wie gestörtes Allgemeinbefinden, Fieber und Inappetenz. Bisher nicht bei NWK in Verbindung mit der CPXV-Infektion dokumentiert sind Erbrechen und Durchfall. Ebenso wurden keine auffälligen respiratorischen Symptome beschrieben. Da jedoch bei der klinischen Untersuchung Veränderungen im oberen Respirationstrakt wie muköser bis mukopurulenter Nasenausfluss und Rhinitis festgestellt wurden (22, 47) und sich bei der postmortalen Untersuchung CPXV in der Lunge nachweisen ließ (22), kann auch

bei NWK von einer Beteiligung des Respirationstraktes im Rahmen der CPXV-Infektion ausgegangen werden.

Eine hochgradige Keratokonjunktivitis (47) oder eine Konjunktivitis mit zentraler milchiger Trübung der Hornhaut (22) wurden nach Kenntnis der Autoren bisher ausschließlich bei der CPXV-Infektion beim Alpaka beschrieben. Nach Fallberichten aus der Humanmedizin kann es auch beim Menschen im Rahmen einer CPXV-Infektion zu einer Keratitis kommen (30, 48). In einem der dokumentierten Fälle bei Alpakas mussten laut Vorbericht auch Chlamydien als ursächliches Agens der Keratokonjunktivitis in Betracht gezogen werden. Durch histologischen Nachweis intrazytoplasmatischer eosinophiler Einschlusskörperchen in den Läsionen der Hornhaut ließ sich allerdings das CPXV als Ursache bestätigen (47).

Bei Katzen (21) und Elefanten (45) wurden in Verbindung mit der CPXV-Infektion Hautläsionen im Gliedmaßenbereich beschrieben. In der Folge kam es durch Schwellung und Schmerzhaftigkeit von Gelenken und dem umliegenden Weichteilgewebe zu hochgradigen Lahmheiten. Möglicherweise spielen hier auch die beim Menschen beobachtete schmerzhafte Lymphadenitis und Lymphadenopathie ursächlich eine Rolle (54). Bei einem Alpaka wurden Hautläsionen an beiden Tarsalgelenken festgestellt, die zu einer starken Ödematisierung des subkutanen Gewebes inklusive der Sehnenscheiden führten (47). In dieser Alpakaherde wurden vorberichtlich Chlamydien als Ursache purulenter Arthritiden erwähnt und bei der postmortalen Untersuchung aus der Gelenkflüssigkeit einiger Tiere isoliert (47). Aus der Beschreibung geht jedoch nicht hervor, ob diese Erreger am akuten Krankheitsprozess und der damit verbundenen Symptomatik im Bereich des Bewegungsapparats beteiligt waren.

Eine Unterteilung der CPXV-Infektion in eine lokal begrenzte und in eine generalisierte Verlaufsform, wie für Wiederkäuer dargestellt (40), kann bei Alpakas und Lamas gleichermaßen nachvollzogen werden. Eine Verlaufsform, die ohne klinische Symptome oder nahezu symptomlos verläuft und bei NWK vermutet wird, ist für wildlebende Nager beschrieben (29, 42). Diese Ausprägung wird auch bei anderen Tierarten erwähnt (5, 36, 37). Es stellt sich dennoch die Frage, ob unter Umständen Primärläsionen (Haut/Schleimhaut) bei der klinischen Untersuchung nicht wahrgenommen wurden oder zu diesem Zeitpunkt schon abgeheilt waren. Denkbar wäre somit auch, dass dieser vermeintlich subklinische Verlauf der lokal begrenzten Verlaufsform zuzuordnen ist. Gerade bei NWK werden durch das vergleichsweise lange Vlies milde Verlaufsformen mit lokal begrenzten, kleineren Hauteffloreszenzen möglicherweise leicht übersehen.

Verschiedene Faktoren können Einfluss auf den Verlauf der CPXV-Infektion haben. Bei den NWK überwiegen die Beschreibungen der generalisierten Verlaufsform. In allen drei Fallberichten wurden

bei den Tieren Vor- und Begleiterkrankungen dokumentiert: eine Infektion mit *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bei einer Lamastute (10), seit 3 Monaten bestehende hochgradige borkige Hautveränderungen mit Verdacht auf Räude bei einer Alpakastute (22) bzw. eine chronische Chlamydieninfektion in der gesamten Alpakaherde (47). Zwei Alpakastuten mit einer generalisierten Infektion waren zudem trächtig (22, 47). Alle diese Faktoren haben mit großer Wahrscheinlichkeit diesen Krankheitsverlauf begünstigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die CPXV-Infektion bei NWK eine bisher selten beschriebene Erkrankung ist. Wie häufig sie in deutschen oder anderen europäischen NWK-Beständen tatsächlich auftritt, kann derzeit nicht beurteilt werden. Durch die Haltung der Tiere in Herden im Offenstall oder auf der Weide ist der Kontakt zu Nagetieren als vermutetes Erregerreservoir und eine Übertragung durch direkten Tierkontakt auf jedes einzelne Tier in der Herde jederzeit möglich. Zur Epidemiologie und Pathogenese der Infektion bei NWK fehlen eingehende Untersuchungen. Das durch ihre vielfältigen Nutzungsformen bedingte Risiko einer Übertragung der CPXV-Infektion auf den Menschen in einer Bevölkerung mit schwindendem Pockenimpfschutz nach Wegfall der Pockenschutzimpfung (54) kann derzeit nicht abgeschätzt werden. Nach Auffassung der Autoren besteht somit dringender Forschungsbedarf, um die Epidemiologie und Pathogenese dieser Erkrankung speziell bei NWK besser zu verstehen. Untersuchungen zum Erregerreservoir und zur Erregerverbreitung in Alpaka- und Lamaherden wären wünschenswert.

Nach der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten sind CPXV-Infektionen bisher nur bei Einhufern, Rindern, Schweinen, Ziegen, Katzen, Hasen und Kaninchen meldepflichtig (53), obwohl diese Erkrankung bei einer weitaus größeren Anzahl an Tierarten beschrieben wurde, die zumeist in Zoos und Zirkussen gehalten werden (13). NWK nehmen hier wohl eine Sonderstellung ein, da sie bei uns früher in Zoos gehalten wurden, während sie in den letzten 40 Jahren auch in Europa ihren Status als Hobby- und Nutztier etabliert haben (17). Aufgrund der Empfänglichkeit von NWK für CPXV wäre eine Aufnahme in die Meldepflicht auch bei diesen Tieren in Betracht zu ziehen, falls sich die Erkrankungsfälle mit CPXV häufen.

Nach aktuellem Kenntnisstand ist in der Veterinärmedizin keine kausale Therapie einer CPXV-Infektion verfügbar (33). Bei Elefanten ermöglicht die Vakzination mit dem MVA-Impfstoff (MVA: modifiziertes Vacciniavirus Ankara) eine sichere Prophylaxe der CPXV-Infektion (33, 35, 44). Es stellt sich die Frage, ob eine MVA-Impfung gegebenenfalls auch bei NWK prophylaktisch einsetzbar ist.

## **5. Fazit**

Die Kuhpockenvirusinfektion ist eine Zoonose und bei vielen Tierarten (nicht jedoch NWK) eine meldepflichtige Erkrankung. Aufgrund der steigenden Popularität der NWK als Hobby- und Nutztiere

in Europa und dem möglichen engen Kontakt zu Menschen ist es für den praktischen Tierarzt von Interesse, das klinische Erscheinungsbild dieser Erkrankung im Detail zu kennen. Ziel muss sein, bei der klinischen Untersuchung eine Verdachtsdiagnose stellen zu können. Diese Erkrankung tritt auch bei Neuweltkameliden in zwei klinischen Verlaufsformen auf. Die Symptome können tierindividuell unterschiedlich ausgeprägt sein. Bei umschriebenen Haut- und Schleimhautläsionen in Form von Papeln, Pusteln, Krusten oder ulzerierenden Wunden, egal ob einzeln, lokal begrenzt oder generalisiert auftretend, sollte die Differentialdiagnose Kuhpockenvirusinfektion durch eine virologische/molekularbiologische Untersuchung abgeklärt werden. Hierfür stehen an den Landesuntersuchungsämtern zuverlässige, validierte Techniken zum Genomnachweis zur Verfügung, die zeitnah Ergebnisse liefern. Das erkrankte Tier sollte umgehend von der Herde separiert und geeignete Hygiene- und Quarantänemaßnahmen eingehalten werden. Während es bei lokal begrenzter Verlaufsform oft nach 3 – 4 Wochen zur Abheilung der Läsionen kommt, führt der generalisierte Verlauf innerhalb weniger Tage zum Niederbruch des betroffenen Tieres und endet zumeist tödlich.

## **6. Interessenkonflikt**

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenkonflikt besteht.

## 7. Abbildungen



Abb. 1: Perinealbereich einer Alpakastute mit Kuhpockenvirusinfektion: zwei umschriebene Hautläsionen neben der Vulva mit oberflächlichen Krusten. (Foto: Klinik für Klauentiere, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig)

Fig. 1: Clinical findings of cowpox virus infection in an alpaca mare: two circumscribed lesions with superficial crusts beside the vulva. (photo: Clinic for Ruminants and Swine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig)



Abb. 2: Auge einer Alpakastute mit Kuhpockenvirusinfektion: mukopurulente Keratokonjunktivitis mit zentraler milchiger Trübung der Kornea. (Foto: Klinik für Klauentiere, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig)

Fig. 2: Clinical findings of cowpox virus infection in an alpaca mare: mucopurulent keratoconjunctivitis and focal milky opacification of the cornea. (photo: Clinic for Ruminants and Swine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig)

## 8. Literatur

1. Appl C, Bomhard W von, Hanczaruk M, Meyer H, Bettenay S, Mueller R. Feline cowpoxvirus infections in Germany: clinical and epidemiological aspects. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 2013; 126 (1/2): 55–61.
2. Basse A, Freundt EA, Falmer Hansen J. Ein Ausbruch von Pockenkrankheit bei Okapis im Kopenhagener Zoo. *Verh ber Erkrgr Zootiere* 1964; 6: 55–62.
3. Baxby D, Ashton DG, Jones DM, Thomsett LR. An outbreak of cowpox in captive cheetahs: virological and epidemiological studies. *J Hyg Camb* 1982; 89: 365–372.
4. Bennett M, Gaskell CJ, Gaskell RM, Baxby D, Gruffydd-Jones TJ. Poxvirus infection in the domestic cat: Some clinical and epidemiological observations. *Vet Rec* 1986; 118: 387–390.
5. Bennett M, Gaskell RM, Gaskell CJ, Baxby D, Kelly DF. Studies on poxvirus infection in cats. *Arch Virol* 1989; 104: 19–33.
6. Bomhard D von, Pfleghaar S, Mahnel H. Zur Epidemiologie, Klinik, Pathologie und Virologie der Katzen-Pocken-Infektion. *Kleintierprax* 1992; 37: 219–230.
7. Bomhard W von, Mauldin EA, Breuer W, Pfleghaar S, Nitsche A. Localized cowpox infection in a 5-month-old Rottweiler. *Vet Dermatol* 2011; 22 (1): 111–114.
8. Breithaupt A, Kalthoff D, Deutskens F, König P, Hoffmann B, Beer M, Meyer H, Teifke JP. Clinical Course and Pathology in Rats (*Rattus norvegicus*) After Experimental Cowpox Virus Infection by Percutaneous and Intranasal Application. *Vet Pathol* 2012; 49 (6): 941–949.
9. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. Zahl der Woche: 13.000 Alpakas werden in Deutschland gehalten. Pressemitteilung Nr.39 vom 29.01.13. <http://www.bmelv.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/2013/039-Zahl-der-Woche.html>.
10. Cardeti G, Brozzi A, Eleni C, Polici N, D'Alterio G, Carletti F, Scicluna MT, Castiletti C, Capobianchi MR, Di Caro A, Autorino GL, Amaddeo D. Cowpox Virus in Llama, Italy. *Emerg Infect Dis* 2011; 17 (8): 1513–1515.
11. Chantrey J, Meyer H, Baxby D, Begon M, Bown KJ, Hazel SM, Jones T, Montgomery WI, Bennett M. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol Infect* 1999; 122: 455–460.
12. Eis-Hübinger AM, Gerritzen A, Schneweis KE, Pfeiff B, Pullmann H, Mayr A, Czerny C-P. Fatal cowpox-like virus infection transmitted by cat. *Lancet* 1990; 336 (8719): 880.
13. Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H. Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol* 2010; 140 (3-4): 229–236.
14. Franke A, Kershaw O, Jenckel M, König L, Beer M, Hoffmann B, Hoffmann D. Fatal Cowpox Virus Infection in an Aborted Foal. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2016; 16 (6): 431–433.
15. Franke A, Pfaff F, Jenckel M, Hoffmann B, Höper D, Antwerpen M, Meyer H, Beer M, Hoffmann D. Classification of Cowpox Viruses into Several Distinct Clades and Identification of a Novel Lineage. *Viruses* 2017; 9 (6).
16. Gaskell RM, Gaskell CJ, Evans RJ, Dennis PE, Bennett AM, Udall ND, Voyle C, Hill TJ. Natural and experimental pox virus infection in the domestic cat. *Vet Rec* 1983; 112: 164–170.
17. Gauly M, Vaughan J, Cebra C, Hrsg. *Neuweltkameliden - Haltung, Zucht, Erkrankungen*, 3. Aufl. Stuttgart: Enke 2010.
18. Gazzani P, Gach JE, Colmenero I, Martin J, Morton H, Brown K, Milford DV. Fatal disseminated cowpox virus infection in an adolescent renal transplant recipient. *Pediatr Nephrol* 2017; 32 (3): 533–536.

19. Gehring H, Mayer H. Beitrag zur Diagnostik und Bekämpfung der Pockeninfektion bei Elefanten. *Prakt Tierarzt* 1978; 59: 106–109.
20. Gibbs EPJ, Johnson RH, Collings DF. Cowpox in a Dairy Herd in the United Kingdom. *Vet Rec* 1973; 92: 56–64.
21. Godfrey DR, Blundell CJ, Essbauer S, Pfeffer M, Shearer DH, Rest JR, Baker JFM. Unusual presentations of cowpox infection in cats. *J Small Anim Pract* 2004; 45: 202–205.
22. Goerigk D, Theuß T, Pfeffer M, Konrath A, Kalthoff D, Woll D, Vahlenkamp TW, Beer M, Starke A. Kuhpockenvirusinfektion bei einem Alpaka (*Vicugna pacos*) - klinische Symptomatik, Diagnostik und pathologische Befunde. *Tierärztl Prax* 2014; 42 (G): 169–177.
23. Halsby K, Twomey DF, Featherstone C, Foster A, Walsh A, Hewitt K, Morgan D. Zoonotic diseases in South American camelids in England and Wales. *Epidemiol Infect* 2017; 145 (5): 1037–1043.
24. Hoffmann D, Franke A, Jenckel M, Tamošiūnaitė A, Schluckebier J, Granzow H, Hoffmann B, Fischer S, Ulrich RG, Höper D, Goller K, Osterrieder N, Beer M. Out of the Reservoir. Phenotypic and Genotypic Characterization of a Novel Cowpox Virus Isolated from a Common Vole. *J Virol* 2015; 89 (21): 10959–10969.
25. Jäger K, Steinborn P, Weider K, Wohlsein P. Kutane Infektion mit Orthopoxvirus bovis bei einem Wachtelhund. *Tierärztl Prax* 2016; 44 (K) (4): 273–277.
26. Johnson RF, Hammoud DA, Lackemeyer MG, Yellayi S, Solomon J, Bohannon JK, Janosko KB, Jett C, Cooper K, Blaney JE, Jahrling PB. Small particle aerosol inoculation of cowpox Brighton Red in rhesus monkeys results in a severe respiratory disease. *Virology* 2015; 481: 124–135.
27. Johnson RF, Hammoud DA, Perry DL, Solomon J, Moore IN, Lackemeyer MG, Bohannon JK, Sayre PJ, Minai M, Papaneri AB, Hagen KR, Janosko KB, Jett C, Cooper K, Blaney JE, Jahrling PB. Exposure of rhesus monkeys to cowpox virus Brighton Red by large-particle aerosol droplets results in an upper respiratory tract disease. *J Gen Virol* 2016; 97 (8): 1942–1954.
28. Johnson RF, Yellayi S, Cann JA, Johnson A, Smith AL, Paragas J, Jahrling PB, Blaney JE. Cowpox virus infection of cynomolgus macaques as a model of hemorrhagic smallpox. *Virology* 2011; 418 (2): 102–112.
29. Kinnunen PM, Henttonen H, Hoffmann B, Kallio ER, Korthase C, Laakkonen J, Niemimaa J, Palva A, Schlegel M, Ali HS, Suominen P, Ulrich RG, Vaheri A, Vapalahti O. Orthopox Virus Infections in Eurasian Wild Rodents. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11 (8): 1133–1140.
30. Kinnunen PM, Holopainen JM, Hemmilä H, Piiparinen H, Sironen T, Kivelä T, Virtanen J, Niemimaa J, Nikkari S, Järvinen A, Vapalahti O. Severe Ocular Cowpox in a Human, Finland. *Emerg Infect Dis* 2015; 21 (12): 2261–2263.
31. Kramski M, Mätz-Rensing K, Stahl-Hennig C, Kaup F-J, Nitsche A, Pauli G, Ellerbrok H. A Novel Highly Reproducible and Lethal Nonhuman Primate Model for Orthopox Virus Infection. *PloS one* 2010; 5 (4): e10412.
32. Kuntze A. Zur Klinik der Pocken bei Asiatischen Elefanten (*Elephas maximus*). 1. Mitteilung: Pockeneinbruch und -verlauf in einer elfköpfigen Elefantenherde. *Verh ber Erkrgr Zootiere* 1974; 16: 281–288.
33. Kurth A, Nitsche A. Cowpox in Zoo Animals. In: *Fowler's zoo and wild animal medicine. Current therapy*, 7. Aufl. Miller RE, Fowler ME, eds. St. Louis, Mo: Elsevier/Saunders 2012; 32–37.

34. MacLachlan NJ, Fenner F, Dubovi EJ, Hrsg. Fenner's veterinary virology, 4. Aufl. Amsterdam: Academic Press 2011.
35. Mahnel H, Mayr A. Erfahrungen bei der Schutzimpfung gegen Orthopocken von Mensch und Tier mit dem Impfstamm MVA. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 1994; 107: 253–256.
36. Marennikova SS, Maltseva NN, Korneeva VI, Garanina NM. Outbreak of Pox Disease among Carnivora (Felidae) and Edentata. J Infect Dis 1977; 135 (3): 358–366.
37. Martina BEE, van Doornum G, Dorrestein GM, Niesters HGM, Stittelaar KJ, Wolters, Marno A. B. I., van Bolhuis, Hester G. H., Osterhaus, Albert D. M. E. Cowpox Virus Transmission from Rats to Monkeys, the Netherlands. Emerg Infect Dis 2006; 12 (6): 1005–1007.
38. Martland MF, Poulton GJ, Done RA. Three cases of cowpox infection of domestic cats. Vet Rec 1985; 117: 231–233.
39. Mätz-Rensing K, Stahl-Hennig C, Kramski M, Pauli G, Ellerbrok H, Kaup F-J. The Pathology of Experimental Poxvirus Infection in Common Marmosets (*Callithrix jacchus*). Further Characterization of a New Primate Model for Orthopoxvirus Infections. J Comp Path 2012; 146 (2-3): 230–242.
40. Mayr A, Czerny C-P. Cowpox Virus. In: Virus Infections of Ruminants. Dinter Z, Morein B, eds. Amsterdam, New York: Elsevier 1990; 9–15.
41. McInerney J, Papasouliotis K, Simpson K, English K, Cook S, Milne E, Gunn-Moore DA. Pulmonary cowpox in cats: five cases. J Feline Med Surg 2016; 18 (6): 518–525.
42. Osterrieder K. Familie Poxviridae. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 10. Aufl. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. Stuttgart: Enke 2015; 405–418.
43. Pfeffer M, Burck G, Meyer H. Kuhpockenviren in Deutschland: Eine Analyse von 5 Fällen aus dem Jahr 1998. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 1999; 112: 334–338.
44. Pilaski J, Jacoby F. Die Kuhpocken-Erkrankungen der Zootiere. Verh ber Erkr Zootiere 1993; 35: 39–50.
45. Pilaski J, Witzendorff P von, Brandt H-P, Höhr D. Ein Pockenausbruch bei Elefanten (*Elephas maximus*, *Loxodonta africana*) in einem Wanderzirkus während des Aufenthaltes im Winterquartier. Verh ber Erkr Zootiere 1995; 37: 357–363.
46. Schaller K, Pilaski J. Pocken bei Breitmaulnashörnern (*Ceratotherium s. simum*) im Zoologischen Garten Münster. Zool. Garten N.F. 1979; 49 (3): 169–184.
47. Schüppel K-F, Menger S, Eulenberger K, Bernhard A, Pilaski J. Kuhpockeninfektion bei Alpakas (*Lama Glama pacos*). Verh ber Erkr Zootiere 1997; 38: 259–265.
48. Schwarzer H, Kurth A, Hermel M, Plange N. Severe ulcerative keratitis in ocular cowpox infection. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2013; 251 (5): 1451–1452.
49. Smee DF, Gowen BB, Wandersee MK, Wong M-H, Skirpstunas RT, Baldwin TJ, Hoopes JD, Sidwell RW. Differential pathogenesis of cowpox virus intranasal infections in mice induced by low and high inoculum volumes and effects of cidofovir treatment. Int J Antimicrob Agents 2008; 31 (4): 352–359.
50. Smith AL, St Claire M, Yellayi S, Bollinger L, Jahrling PB, Paragas J, Blaney JE, Johnson RF. Intrabronchial inoculation of cynomolgus macaques with cowpox virus. J Gen Virol 2012; 93 (Pt 1): 159–164.



51. Smith SA, Kotwa GJ. Immune response to poxvirus Infections in various animals. *Crit Rev Microbiol* 2002; 28 (3): 149–185.
52. Tack DM, Reynolds MG. Zoonotic poxviruses associated with companion animals. *Animals* 2011; 1 (4): 377–395.
53. Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten [2015], Bundesgesetzblatt Jahrgang 2015, Teil I, Nr. 35, S. 1474, Art. 381 vom 31. August 2015; [https://www.gesetze-im-internet.de/tkrmeldpflv\\_1983/BJNR010950983.html](https://www.gesetze-im-internet.de/tkrmeldpflv_1983/BJNR010950983.html).
54. Vorou RM, Papavassiliou VG, Pierroutsakos IN. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21 (2): 153–156.
55. Wisser J, Pilaski J, Strauss G, Meyer H, Burck G, Truyen U, Rudolph M, Frölich K. Cowpox virus infection causing stillbirth in an Asian elephant (*Elephas maximus*). *Vet Rec* 2001; 149: 244–246.
56. Yeruham I, Nyska A, Abraham A, Algazi R. Occurrence of cowpox-like lesions in cattle in Israel. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1996; 49 (4): 299–302.
57. Zhukova OA, Tsanova SA, Marennikova SS. Experimental infection of domestic cats by cowpox virus. *Arch Virol* 1992; 36: 329–331.
58. Zwart P, Gipsen R, Peters JC. Cowpox in opakis (*Okapia johnstoni*) at Rotterdam Zoo. *Br Vet J* 1971; 127: 20–23.

## 4 Publikation 2

### **Epidemiological Investigations of Four Cowpox Virus Outbreaks in Alpaca Herds, Germany**

Almut Prkno, Donata Hoffmann, Daniela Goerigk, Matthias Kaiser, Anne Catherine Franscisca van Maanen, Kathrin Jeske, Maria Jenckel, Thomas W. Vahlenkamp, Martin Beer, Rainer G. Ulrich, Alexander Starke and Martin Pfeffer


Viruses. 2017;9(11)

DOI: 10.3390/v9110344

Almut Prkno war maßgeblich in die Konzeptentwicklung, die Studienplanung und -durchführung einbezogen. Sie war für die Durchführung der praktischen Tätigkeiten in den Herden III und IV (klinische Untersuchung und Probenentnahme aller Tiere im Bestand, Koordination des Fangens der Nager) verantwortlich und hat diese mit Unterstützung von Matthias Kaiser durchgeführt. Almut Prkno führte die Aufbereitung der erhobenen Daten aller vier Bestände selbstständig durch und analysierte und interpretierte mit Unterstützung von Martin Pfeffer, Donata Hoffmann und Rainer G. Ulrich die Ergebnisse. Almut Prkno war für die Begutachtung der Literatur verantwortlich und federführend bei der Erstellung des Manuskriptes für diese Publikation.

## Article

# Epidemiological Investigations of Four Cowpox Virus Outbreaks in Alpaca Herds, Germany

Almut Prkno <sup>1,†</sup>, Donata Hoffmann <sup>2,†</sup>, Daniela Goerigk <sup>3</sup>, Matthias Kaiser <sup>1</sup>, Anne Catherine Franscisca van Maanen <sup>4</sup>, Kathrin Jeske <sup>5</sup>, Maria Jenckel <sup>2</sup>, Florian Pfaff <sup>2</sup> , Thomas W. Vahlenkamp <sup>6</sup>, Martin Beer <sup>2</sup>, Rainer G. Ulrich <sup>5</sup>, Alexander Starke <sup>1</sup> and Martin Pfeiffer <sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup> Clinic for Ruminants and Swine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 11, 04103 Leipzig, Germany; ap81weru@studserv.uni-leipzig.de (A.P.); mkaiser@vetmed.uni-leipzig.de (M.K.); alexander.starke@vetmed.uni-leipzig.de (A.S.)

<sup>2</sup> Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Germany; Donata.Hoffmann@fli.de (D.H.); Maria.Jenckel@fli.de (M.J.); Florian.Pfaff@fli.de (F.P.); Martin.Beer@fli.de (M.B.)

<sup>3</sup> Veterinary practice Dr. Daniela Goerigk, Naundorfer Str. 9, 04668 Schkortitz, Germany; info@tierarzt-goerigk.de

<sup>4</sup> Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Centre for Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany; acfvmaanen@yahoo.co.uk

<sup>5</sup> Institute of Novel and Emerging Infectious Diseases, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Germany; kathrin.jeske@fli.de (K.J.); Rainer.Ulrich@fli.de (R.G.U.)

<sup>6</sup> Institute of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 29, 04103 Leipzig, Germany; vahlenkamp@vetmed.uni-leipzig.de

\* Correspondence: pfeiffer@vetmed.uni-leipzig.de; Tel.: +49-341-9738152

† These authors contributed equally to this work.

Received: 2 October 2017; Accepted: 13 November 2017; Published: 18 November 2017

**Abstract:** Four cowpox virus (CPXV) outbreaks occurred in unrelated alpaca herds in Eastern Germany during 2012–2017. All incidents were initially noticed due to severe, generalized, and finally lethal CPXV infections, which were confirmed by testing of tissue and serum samples. As CPXV-infection has been described in South American camelids (SACs) only three times, all four herds were investigated to gain a deeper understanding of CPXV epidemiology in alpacas. The different herds were investigated twice, and various samples (serum, swab samples, and crusts of suspicious pox lesions, feces) were taken to identify additionally infected animals. Serum was used to detect CPXV-specific antibodies by performing an indirect immunofluorescence assay (iIFA); swab samples, crusts, and feces were used for detection of CPXV-specific DNA in a real-time PCR. In total, 28 out of 107 animals could be identified as affected by CPXV, by iIFA and/or PCR. Herd seroprevalence ranged from 16.1% to 81.2%. To investigate the potential source of infection, wild small mammals were trapped around all alpaca herds. In two herds, CPXV-specific antibodies were found in the local rodent population. In the third herd, CPXV could be isolated from a common vole (*Microtus arvalis*) found drowned in a water bucket used to water the alpacas. Full genome sequencing and comparison with the genome of a CPXV from an alpaca from the same herd reveal 99.997% identity, providing further evidence that the common vole is a reservoir host and infection source of CPXV. Only in the remaining fourth herd, none of the trapped rodents were found to be CPXV-infected. Rodents, as ubiquitous reservoir hosts, in combination with increasingly popular alpacas, as susceptible species, suggest an enhanced risk of future zoonotic infections.

**Keywords:** cowpox virus; *Orthopoxvirus*; South American camelids; common vole (*Microtus arvalis*); reservoir host; spill-over infection; zoonosis

## 1. Introduction

The Alpaca (*Vicugna pacos*) is one of four species of South American camelids (SACs). Originating from the Andean plateaus in South America, they were introduced to Europe about 40 years ago [1]. Alpacas are commonly held in flocks in open stabling or pasture feeding [1]. Primarily used as livestock for breeding for wool and meat production, they are also kept as pets for landscape conservation, animal-assisted therapy, or recreational activities like trekking [1–4]. Compared to other indigenous livestock, infectious diseases in SACs are still insufficiently studied. Nevertheless, there is a noticeable increase in research [4–10].

Cowpox virus (CPXV) is a member of the family *Poxviridae*, genus *Orthopoxvirus* (OPV) and endemic in Western Eurasia [11,12]. CPXV infections have been increasingly described in domestic (cats, dogs, horses) [13–16] and zoo animals (e.g., elephants, rhinoceros, okapis, lions, cheetahs, anteaters, monkeys) [11,17]. Zoonotic virus transmission to humans occurs via direct contact to infected animals [11] resulting in sporadic cases.

Domestic and zoo animals as well as humans are suspected to be accidental hosts of CPXV, caused by spill-over infections from reservoir hosts [18]. Investigations on wild rodents in different European countries identified bank voles (*Myodes glareolus*), field voles (*Microtus agrestis*), common voles (*Microtus arvalis*), striped field mice (*Apodemus agrarius*), wood mice (*Apodemus sylvaticus*), and yellow-necked field mice (*Apodemus flavicollis*) as putative reservoir hosts of CPXV [17–22]. They also indicate a seasonality of CPXV infections in rodent populations with peaks in late summer and autumn due to the highest rodent population density at that time [20,21]. Epidemiological investigations of CPXV infection in cats [23–25] and zoo animals [17] indicate seasonal peaks during the year, as well, with a major peak in late summer/autumn (August–October) and a smaller one in winter (February–March). Most cats are thought to become infected while hunting wild rodents [23], while elephants, as well as other herbivores are assumed to become infected by feeding on grass, hay, or straw contaminated with rodent feces or urine containing CPXV [26,27].

Thus far, only three cases of CPXV infection of SACs were reported; they described either an individual or small groups of animals being affected [28–30].

Between June 2012 and January 2017, four separate clusters of CPXV infections were detected in alpacas from four unrelated herds in Eastern Germany. Common to all, initially one animal with generalized CPXV infection was referred to the Clinic for Ruminants and Swine (Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany). Despite intensive care, all four index cases finally succumbed to the disease.

The aim of this study was to investigate the epidemiology of the four clusters of CPXV infection in these alpaca herds. Therefore, the occurrence of CPXV was evaluated in individual alpacas and putative rodent reservoirs by testing CPXV-specific antibodies and DNA and by virus isolation and sequencing. Comparing the results of all four alpaca herds made it possible to draw the first important conclusions on epidemiological aspects like the mode of transmission, the seasonality of the outcome, the role of reservoir hosts, and a possible zoonotic risk.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Alpaca Herds

The study included in total 107 alpacas (37 male; 70 female) of different ages and breeds (104 Huacaya; 3 Suri) out of four herds in Eastern Germany (see Table 1). In three of the four herds, animals are subdivided into different gender-dependent flocks (e.g., stallions, mares, mares and crias), which can vary throughout the year depending on the breeding season. These subdivisions are made by the owners of the herds and do not have any influence on the study. During the time of sampling, there were 8 flocks in herd I, 5 flocks in herd II, and 3 flocks in herd III. There was no further subdivision in herd IV. Direct animal contact between the flocks in each herd was only possible between single flocks (herd I: 2 of 8 flocks, herd II: 2 of 5 flocks, herd III: 2 of 3 flocks). The husbandry systems used

were perennial open stabling (herds I, III and IV) and a combination of pasture feeding in summer and open stabling in winter (herd II). Besides pasturage, there was open access to hay and water in all flocks of all four herds. Supplementary feeding of SACs-specific mineral feed or concentrated feed was sporadically done in a herd-dependent manner. Furthermore, other animal species were held in herd III (dogs) and herd IV (cats, dogs, poultry), but not in herds I and II.

**Table 1.** Herd specific data and sampling information.

Herd Specific Data	Herd I		Herd II		Herd III		Herd IV	
State	Thuringia		Saxony-Anhalt		Saxony		Brandenburg	
Total number of animals (107)	55		31		16		5	
Gender distribution								
Male (37)	16		9		10		2	
Female (70)	39		22		6		3	
Age distribution								
<1 year (26)	17		6		1		2	
1–10 years (73)	38		23		10		2	
>10 years (8)	0		2		5		1	
Flocks	8		5		3		1	
Husbandry system	Open stabling (perennial)		Pasture feeding (summer), open stabling (winter)		Open stabling (perennial)		Open stabling (perennial)	
Sampling *								
Total number of animals (103) **	54		30		15		4	
Time interval after index Case (in days)	31		9		50		42	
Day of examination (***)	1	2 (50)	1	2 (54)	1	2 (19)	1	2 (28)
Clinical examination	x (15)	x	x	-	x	x	x	x
(Blood) serum	x (15)	x	x	x (4)	x	x	x	x
(Blood) EDTA	x (15)	x	x	-	x	-	x	-
(Blood) lithium-heparin	x (15)	x	x	-	x	-	x	-
Swab (conjunctival)	-	-	-	-	x	x	x	x
Swab (oral mucous membrane)	-	-	x	-	x	x	x	x
Swab (nasal mucous membrane)	-	-	-	-	x	x	x	x
Swab (other)	-	-	-	-	x (8)	x (11)	x (1)	x (3)
Crusts (skin lesions)	-	-	-	-	x (2)	x (3)	x (1)	x (1)
Feces	-	-	-	-	x	x	x	x

\* sampling includes two visits per alpaca herd after index case in clinic; \*\* 4 alpacas (index cases) not included; \*\*\* in brackets, time interval (in days) after first examination; x all alpacas of one herd sampled; x ( ) particular number of animals of one herd sampled; - not sampled. EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid.

## 2.2. Index Patients History

Out of every herd, initially, one animal was referred to the Clinic for Ruminants and Swine, showing symptoms of generalized CPXV infection. These index cases brought the four unrelated clusters of CPXV infection to our attention. Additionally, there was another animal out of herd II referred to the clinic with generalized CPXV infection 65 days after the index case of this herd. All five animals succumbed to the disease. To investigate if and how CPXV spreads throughout the herds, we subsequently visited the corresponding alpaca herds. Each herd was visited twice with clinical examination and sampling of the animals as shown in Table 1.

## 2.3. Sampling

Clinical examination of the alpacas was done according to Baumgartner, 2002, using reference values for SACs as described previously [1,31,32].

Blood samples (serum, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), lithium-heparin) were obtained by puncture of the jugular vein on the left or right site of the neck, using disposable injection cannulas (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany), serum-sample tubes (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany), EDTA-sample tubes, as well as heparin-sample tubes (both, KABE LABORTECHNIK GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Germany). Animals in the clinic were sampled once at the time of their arrival; animals in the herds were sampled as shown in Table 1.

Swab samples were obtained by using dry swabs (KABE LABORTECHNIK GmbH). Depending on the localizations of suspicious pox lesions, swab samples were taken (conjunctiva, nasal mucous membrane, oral mucous membrane, or lesions of the skin, see Table 1).

For virus isolation, crusts of skin lesions were obtained using disposable surgical blades (Bayha GmbH, Tuttigen, Germany) and Cellular Tubes (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). The number of crusts obtained in the herds is shown in Table 1. Furthermore, crusts were obtained from one animal in the clinic (alpaca No. 35, herd II).

After clinical examination, samples of feces were manually obtained out of the rectum of each animal in herds III and IV. These samples were stored in urine specimen cups (KABE LABORTECHNIK GmbH). Swab samples as well as samples of crusts and feces were stored at 4 °C until further processing.

#### 2.4. Small Mammals

Trapping permissions were obtained from the concerned lower nature conservation authority for herds I and II (permit number: herd I—AZ 2013-05062-MK, 17, January, 2013; herd II—407.3.3/359.13-22481, 4, April, 2013). Here, small mammals were caught over a period of three consecutive nights using Sherman live traps baited with apple pieces. Traps were placed strategically, covering all paddock borders and landscape singularities that might be attractive to rodents and other small mammals, and were checked twice daily. Trapped small mammals were subsequently anesthetized using carbon dioxide, followed by blood sample extraction and euthanasia. In herds III and IV small mammals were trapped in the house and stable as a private pest control measure using commercially available snap traps baited with apple pieces over a period of three months. Traps were placed, similarly to herds I and II, close to the open stables and on paddock borders, as well as in the house basement of herd III, and were checked once a day. Trapped small mammals were frozen at −80 °C until necropsy. Necropsy followed a standard protocol with the collection of tissue samples in a defined order. Transudates from snap trapped animals were collected during dissection by washing the chest cavity with 1 mL phosphate-buffered saline (PBS). Taxonomic identification was first done morphologically and then verified by cytochrome *b* gene PCR amplification, sequencing, and sequence comparison to GenBank entries as published previously [33]. All tissue samples, sera, and transudates were stored at −20 °C until further processing.

#### 2.5. Diagnostic Methods

To detect CPXV-specific antibodies in sera of infected alpacas and in sera/transudates of trapped small mammals, an indirect immunofluorescence assay (iIFA) was performed as previously described [18]. A fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-llama conjugate (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA) was used as a secondary antibody for all alpaca samples. For the sera of four alpacas referred to the clinic (Nos. 35, 37—herd II; No. 216—herd III, No. 306—herd IV) and the sera of infected alpacas of herd III, further dilutions up to 1:32,000 were additionally tested in the iIFA.

Swab samples, feces, crusts, and organ tissues (clinic patients) of the alpacas and tissue samples (liver—herds I + II/nasal septum—herds III + IV) of trapped small mammals were used to perform a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) for detecting viral DNA as described before [18,34].

Virus isolation was performed on Vero76 cells (Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine (CCLV), Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Germany). Organ material that scored positive in the qPCR was propagated on Vero76 cells. For identification of the OPV species involved, the hemagglutinin (HA) gene was sequenced (CPXV Ger/2013/Cat/Kira; CPXV Ger/2013/Alpaca/DK13/13; CPXV Ger/2017/Alpaca/00095\_109) or full-length sequencing of CPXV isolate was conducted as described earlier [12] (CPXV Ger/2017/common vole FMEimka). Likewise, the CPXV048 locus (VACV F1L gene homologue) was amplified and sequenced as described before [35]. For phylogenetic analysis, the dataset comprised representative sequences from Old World OPV species camelpox virus, ectromelia virus, monkeypox virus (MPXV), vaccinia virus (VACV), and variola virus (VARV),

as well as New World OPV species, i.e., racoonpox virus, skunkpox virus, and volepox virus. Evolutionary analyses were conducted on the basis of the HA gene using MEGA6 software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.) [36] and the complete genomes of the common vole and alpaca isolates (herd III) were compared with blast (basic local alignment search tool) global alignment (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). All generated sequences were deposited under the ENA-Bioproject with Acc.-No. PRJEB23409 (<http://www.ebi.ac.uk/ena>).

### 3. Results

#### 3.1. CPXV Detection in Four Alpaca Herds

##### 3.1.1. Herd I

In alpaca herd I from Thuringia, consisting of 55 alpacas held in eight flocks, the onset of CPXV infection in June 2012 was noticed as one alpaca mare (No. 176) succumbed to generalized CPXV-disease shortly after submission to the Clinic for Ruminants and Swine [29]. The infection was confirmed by a positive CPXV-specific antibody titer of 1:500 and by detection of viral DNA in tissue samples of the lung, the mucosa of the oral cavity, and the mandibular lymph node post mortem [29]. CPXV was isolated (CPXV *Ger/2012/Alpaca Index-Thuringia*), and analysis of the whole genome sequence grouped it into CPXV-like 1 clade of Old World OPVs [12].

Thirty-one days after the index case, 15 of the remaining 54 animals, that had been kept in the same flock as mare No. 176 in June 2012, were also examined (see Tables 1 and 2). Three of 15 animals (No. 103—flock 4, No. 110—flock 7, No. 165—flock 2) showed CPXV-specific antibodies (at a dilution of 1:500). However, only one of the three animals exhibited focal crusted skin lesions on the face. Unfortunately, these skin lesions were not further investigated for CPXV-specific DNA. Fifty days later in screening the entire herd of 54 animals, five additional alpacas (Nos. 101 and 139—flock 4, Nos. 138 and 145—flock 6, No. 166—flock 7) were tested positive for CPXV-specific antibodies at a dilution of 1:200 and 1:500, respectively. Alpaca No. 103 was again found to be seropositive, now at a dilution of 1:200, whereas alpacas No. 110 and No. 165 were seronegative. Three of six antibody positive animals showed focal crusted skin lesions at that time. These skin lesions were not further investigated for CPXV-specific DNA.

Altogether, there were nine animals (16.4%) out of 55 alpacas in that herd affected by CPXV infection, which belonged to four (flocks 2, 4, 6, and 7) out of eight flocks. Direct animal contact between these infected flocks was not possible, as the flocks were isolated and located around the farmhouse with linear distances of 100 m to ca. 6 km. However, indirect contact through fodder or alpaca-associated utensils cannot be entirely ruled out.

After the second herd investigation, 20 small mammals of five species were trapped (see Table 3): eight striped field mice, one yellow-necked field mouse, six field voles, one bank vole, and four Eurasian pygmy shrews (*Sorex minutus*). Only in five striped field mice were antibodies against CPXV detectable in a dilution of 1:500. None of the small mammals were positive for CPXV-specific DNA.



**Table 2.** Clinical signs and results of cowpox virus investigations of infected alpacas from four herds in Eastern Germany.

Herd	Animal Identification **	Day of Examination ***	Sex	Age (Years)	Clinical Signs	iIFA (Highest Dilution Done)	Real-Time PCR/HA Gene Sequence	Virus Isolate
I	176 #	index case	f	5.5	fatal generalization	1:500	+ /yes	Ger/2012/Alpaca Index-Thuringia*
	103	1	f	6.2	none	1:500	n.d.	n.d.
		2		6.4	local lesions	1:200	n.d.	n.d.
	110	1	f	4.0	none	1:500	n.d.	n.d.
		2		4.2	local lesions	<1:200	n.d.	n.d.
	165	1	m	0.5	local lesions	1:500	n.d.	n.d.
		2		0.7	local lesions	<1:200	n.d.	n.d.
	101	2	f	3.2	none	1:500	n.d.	n.d.
	138	2	ff	5.5	local lesions	1:500	n.d.	n.d.
	139	2	f	9.4	none	1:500	n.d.	n.d.
II	145	2	m	7.4	local lesions	1:200	n.d.	n.d.
	166	2		0.5	none	1:500	n.d.	n.d.
	37	index case	f	10.5	fatal generalization	1:2,000	+ /yes	Ger/2013/Alpaca Index-Saxony-Anhalt*
	16	1	f	1.6	local lesions	1:500	–	n.d.
	12	2	f	1.8	n.d.	1:500	n.d.	n.d.
III	32	2	f	3.9	n.d.	1:500	n.d.	n.d.
	35	clinic	f	10.2	fatal generalization	1:4000	+ /yes	Ger/2013/Alpaca /DK13/13
	216	index case	m	13.1	fatal generalization	<1:200	+ /yes	Ger/2017/Alpaca Index-Saxony*
	201	1	f	8.7	unilateral kerato-conjunctivitis	<1:200	+ /no	n.d.
		2		8.8	local alopecia	1:16,000	–	n.d.
	205	1	f	12.2	local lesions	1:16,000	+ /yes	Ger/2017/Alpaca/00095_109
		2		12.2	local lesions	1:16,000	+ /no	n.d.
	211	1	m	11.5	none	1:4000	–	n.d.
		2		11.6	none	1:8000	–	n.d.
	212	1	m	8.6	local lesions	1:16,000	+ /no	n.d.
IV		2		8.6	local lesions	1:16,000	+ /no	–
	213	1	m	11.8	local alopecia	1:16,000	–	n.d.
		2		11.9	local lesions	1:4000	+ /no	–
	214	1	m	7.8	local alopecia	1:4000	–	n.d.
		2		7.9	local alopecia	1:8000	–	n.d.
	215	1	m	8.9	local alopecia	1:32,000	–	n.d.
		2		8.9	local alopecia	1:32,000	–	n.d.
	202	2	m	0.8	none	1:1000	+ /no	n.d.
	203	2	f	7.9	local alopecia	1:4000	–	n.d.
	204	2	f	3.6	local alopecia	1:8000	–	n.d.
	206	2	f	8.7	none	1:16,000	–	n.d.
	207	2	f	5.8	local lesions	1:8000	–	n.d.
IV	306	index case	f	10.3	fatal generalization	1:500	+ /yes	Ger/2017/Alpaca Index-Brandenburg*

n.d. not done (either real-time PCR was not performed or virus isolation was not attempted when real-time PCR results were negative; clinical examination was not performed); +, positive; –, negative; \* virus isolates, that are already described elsewhere [12]; \*\* animals of each herd are arranged chronologically according to positive results in iIFA or PCR; \*\*\* see Table 1 (day of examination); # published as case report [29]; HA, hemagglutinin; iIFA, indirect immunofluorescence assay; m, male; f, female; Herd I—Thuringia; Herd II—Saxony-Anhalt; Herd III—Saxony; Herd IV—Brandenburg (see Table 1).



**Table 3.** Clinical signs and results of cowpox virus investigations (indirect immunofluorescence assay, real-time PCR and virus isolation) in small mammals and cats from four alpaca herds in Eastern Germany.

Geographic Location	Sample Source	Date	Clinical Signs	Serology (Positive/Tested)		Real-Time PCR/HA Gene Sequence	Virus Isolate
				iIFA 1:200	iIFA 1:500		
Thuringia 2012 (Herd I)	<i>Apodemus agrarius</i>	20–21 September	none	5/8	5/8	–	n.d.
	<i>Apodemus flavicollis</i>	20–21 September	none	0/1	0/1	–	n.d.
	<i>Microtus agrestis</i>	20–21 September	none	0/6	0/6	–	n.d.
	<i>Myodes glareolus</i>	20 September	none	0/1	0/1	–	n.d.
	<i>Sorex minutus</i>	20–21 September	none	0/4	0/4	–	n.d.
Saxony-Anhalt 2013 (Herd II)	<i>Myodes glareolus</i>	1–2 May	none	3/6	2/6	–	n.d.
	<i>Sorex minutus</i>	2 May	none	0/1	0/1	–	n.d.
	Cat	10 October	yes	n.d./1	n.d./1	+ / yes	Ger/2013/Cat/Kira
Saxony 2017 (Herd III)	<i>Apodemus agrarius</i>	26/27/31 March; 17 July	none	0/4	0/4	–	n.d.
	<i>Apodemus flavicollis</i>	20/28 March	none	0/2	0/2	–	n.d.
	<i>Crocidura leucodon</i>	19 March	none	0/1	0/1	–	n.d.
	<i>Crocidura russula</i>	19–31 March	none	0/7	0/7	–	n.d.
	<i>Microtus arvalis</i>	9–26 March; 1 April; 17 July	none	0/11 n.d./3	0/11 n.d./3	+ / yes	Ger/2017/common vole FMEimka
	<i>Talpa europaea</i>	9 March	none	n.d./1	n.d./1	–	n.d.
Brandenburg 2017 (Herd IV)	<i>Mus musculus</i>	March–July	none	0/6	0/6	–	n.d.
	Cat	8 March	none	0/1	0/1	n.d.	n.d.

n.d., not done (virus isolation was not attempted when real-time PCR results were negative or real-time PCR was not performed; iIFA was not performed when no transudate or serum of small mammals was available); –, negative; +, positive; HA, hemagglutinin; iIFA, indirect immunofluorescence assay.

### 3.1.2. Herd II

Alpaca herd II in Saxony-Anhalt, consisting of 31 animals held in five flocks, was investigated for CPXV infection after one mare (No. 37), symptomatic of generalized CPXV infection, was referred to the Clinic for Ruminants and Swine (in March 2013) and died. In this mare, infection was confirmed by detection of CPXV-specific antibodies (1:2000) and CPXV-specific DNA in both swab samples of the conjunctiva and lesions of the mucous membrane of the oral cavity. CPXV could be isolated (CPXV Ger/2013/Alpaca Index-Saxony-Anhalt) and the whole genome sequence again grouped the isolate into CPXV-like 1 clade of Old World OPVs [12].

One week later, the whole herd of 30 remaining animals was investigated (see Tables 1 and 2). One alpaca (No. 16—flock 1) tested positive for CPXV-specific antibodies (dilution 1:500). This animal showed focal crusted skin lesions on its nostrils. Unfortunately, these crusts were not further investigated for CPXV-specific DNA, but a swab sample of the oral mucous membrane of this animal was negative for CPXV-specific DNA. Fifty-four days later, two (Nos. 12 and 32—flock 1) out of four animals investigated for some other reason, were found to be seropositive (dilution 1:500). Another two days later, mare No. 35 (flock 1) was referred to the clinic for Ruminants and Swine with a generalized CPXV infection. This animal tested seronegative two months before and was now found to be positive for CPXV-specific antibodies (1:4000). CPXV-specific DNA was detected in both swabs and crusts of skin lesions on the muzzle, and a virus isolate (CPXV Ger/2013/Alpaca/DK13/13) was obtained.

In this alpaca herd, there were five animals (16.1%) out of 31 alpacas affected by CPXV infection. These were exclusively found in one of four flocks. Direct animal contact to the other flocks was not possible.

Between the two visits for herd investigations, seven small mammals of two species were trapped (see Table 3): six bank voles, and one Eurasian pygmy shrew. Three bank voles tested positive for

CPXV-specific antibodies at dilutions of 1:200 and 1:500, respectively. CPXV-specific DNA was not detected in any of these seven animals.

A cat living in the neighborhood of the alpaca herd was presented to the local veterinarian seven months after the detection of the alpaca index case. This animal showed CPXV-specific clinical signs and CPXV-specific DNA, and a CPXV virus strain was isolated (CPXV *Ger/2013/Cat/Kira*) from a skin sample (See Table 3).

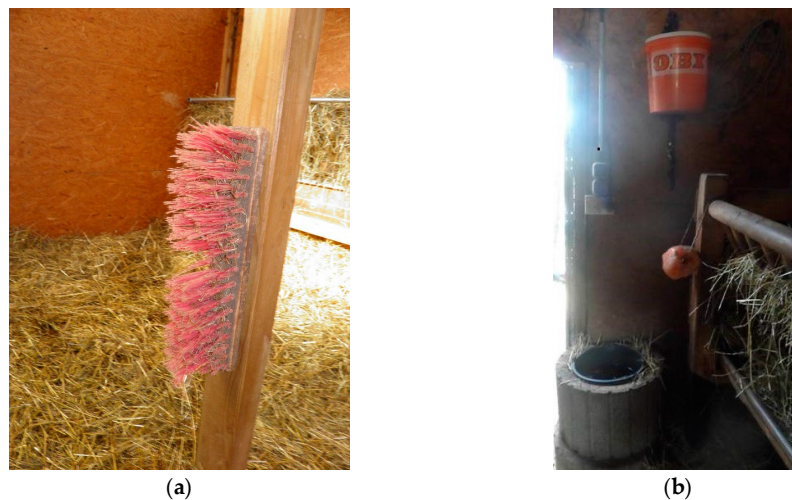
### 3.1.3. Herd III

In Saxony, an alpaca herd, consisting of 16 animals held in three flocks, came to our attention, because one stallion (No. 216) was referred to the Clinic for Ruminants and Swine with generalized CPXV-infection (in January 2017) and died. The animal did not show antibodies against CPXV. Infection was confirmed by detection of CPXV-specific DNA in tissue samples (mucosa of esophagus and oral cavity) post mortem. CPXV was isolated (CPXV *Ger/2017/Alpaca Index-Saxony*), and analyses of the whole genome sequence also grouped this isolate into CPXV-like 1 clade of Old World OPVs [12].

Seven weeks later, all remaining 15 animals of the herd were examined for the first time (see Tables 1 and 2). In flock 1, consisting of six mares and one male cria, there was one mare (No. 205) showing focal crusted skin lesions on the muzzle and nostrils. The animal showed CPXV-specific antibodies (1:16,000), and CPXV-specific DNA was detected in swabs and crusts of skin lesions, as well as in a swab of the nasal mucosa and a feces sample. A CPXV strain (CPXV *Ger/2017/Alpaca/00095\_109*) was isolated in crusts of the skin lesions. Another mare (No. 201) of the same flock showed sudden onset of acute unilateral muco-purulent kerato-conjunctivitis. CPXV-specific DNA was detected in a conjunctival swab of the infected eye and in a swab of focal alopecia around the nose, but no CPXV-specific antibodies were detected. No CPXV-specific antibodies or DNA were detected in the other five animals of this flock. Flock 2, a group of three stallions, did neither reveal any signs of symptoms of CPXV infection nor of CPXV-specific antibodies or DNA. In flock 3, a group of five stallions (Nos. 211, 212, 213, 214, 215) from which the initial case originated, all animals were found to have high CPXV-specific antibody titers (1:4000–1:32,000), and one stallion (No. 212) tested positive for CPXV-specific DNA in a swab of the nasal mucosa. This stallion had focal crusted skin lesions near the medial canthus of both eyes.

Three weeks later, all 15 alpacas were examined a second time following the same investigation pattern as before. In flock 1, all seven animals (Nos. 201–207) were now found seropositive (dilutions 1:1000–1:16,000), but no further animal with clinical symptoms was recorded. Mare No. 205 was still positive for CPXV-specific DNA in the crusts of the skin lesions. In contrast, CPXV-specific DNA was no longer detectable in the conjunctival swab of mare No. 201. One further animal, the male cria (No. 202), tested positive for CPXV-specific DNA in a conjunctival swab, but did not show any clinical symptoms. For the three stallions in flock 2, still no signs of a CPXV infection were found by either clinical symptoms or CPXV-specific antibodies or DNA. In flock 3, all five stallions stayed seropositive with titers of 1:4000 to 1:32,000. Further molecular investigations revealed crusts of the skin lesions near the medial canthus of both eyes in stallion No. 212 to be positive for CPXV-specific DNA, as well as stallion No. 213 to be positive for CPXV-specific DNA in a single crusted skin lesion on the nose (Table 2).

In total, 13 seropositive animals (81.2%) out of 16 alpacas were found in this herd. All these animals belonged to two of three flocks (flocks 1 and 3). Only the two stallion flocks (flocks 2 and 3) could have direct animal contact through the fence of their paddocks, whereas direct contact to the flock of the mares was not possible, as it was about 100 m away from the other two flocks. Points of intersection between the flocks are the direct contact to the farmer's family and their clothes, the hay, that is stored on one central stockyard at the farm, and alpaca-associated utensils, like head collars, lead ropes, and scrubbers. There was a broom for grooming, fixed on a wooden beam, situated in the middle of the stable in flock one (see Figure 1a). Swab sampling revealed detection of CPXV-specific DNA on it.



**Figure 1.** Epidemiological investigations on cowpox virus (CPXV) infection in four alpaca herds in Eastern Germany: (a) a broom for grooming, situated in the stable of flock 1 (herd III), tested positive for CPXV-specific DNA by swab sample; (b) the water bucket (black) in the stable of flock 3 (herd III), where a dead common vole (*Microtus arvalis*), positive for CPXV-specific DNA, was found.

A total of 29 small mammals of six species were trapped at this herd (see Table 3): four striped field mice, two yellow-necked field mice, one bicolored white-toothed shrew (*Crocidura leucodon*), seven common white-toothed shrews (*Crocidura russula*), 14 common voles and one European mole (*Talpa europaea*). In none of these animals were antibodies against CPXV detected. One common vole, however, was positive for CPXV-specific DNA, and a virus was isolated (CPXV Ger/2017/common vole FMEimka). This vole was found dead in the water bucket of flock 3 more than two months after a presumably similar event led to the index case of this herd (see Figure 1b). The entire genome sequence of this CPXV strain was determined.

#### 3.1.4. Herd IV

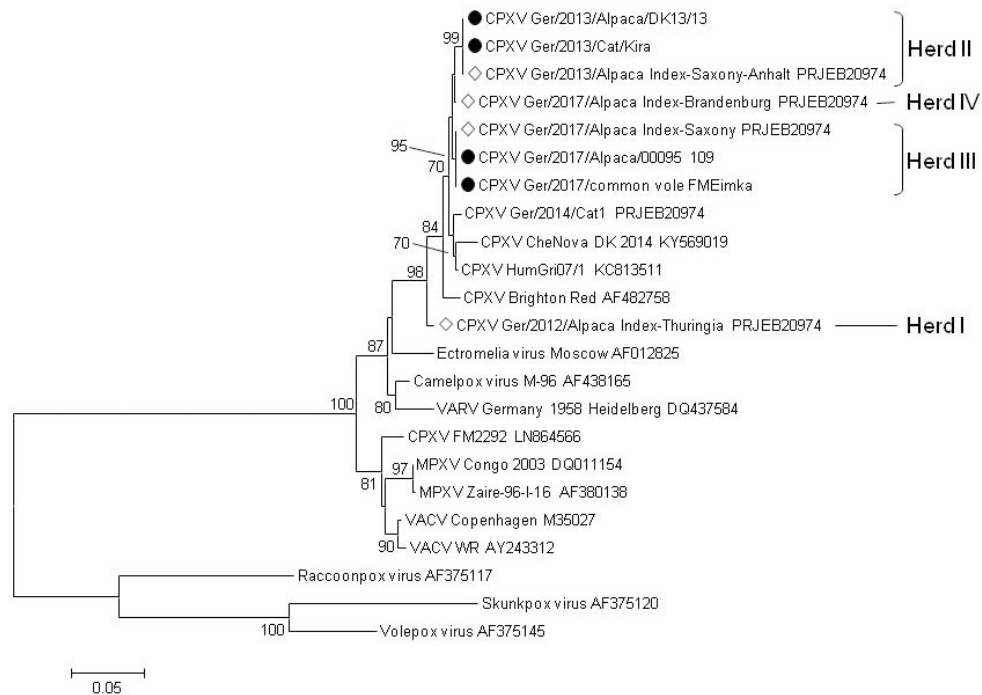
Another case of fatal generalized CPXV infection in an alpaca mare (No. 306) was referred to the Clinic of Ruminants and Swine in January 2017, originating from a small alpaca herd in Brandenburg, with five animals held in one flock. Infection was confirmed by detection of CPXV-specific antibodies (1:500), and post mortem CPXV-specific DNA could be detected in tissue samples of the mucosa of the oral cavity, proventriculus C1, and larynx. Again, a CPXV strain was isolated (CPXV Ger/2017/Alpaca Index-Brandenburg) and the whole genome sequence located this isolate into CPXV-like 1 clade of Old World OPVs [12]. Six weeks after the index case, the remaining four animals were investigated for the first time and another four weeks later for the second time (see Table 1). Neither CPXV-specific clinical signs, nor any CPXV-specific antibody or CPXV DNA positive samples were found in any alpaca in both investigations. In the end, there was one infected animal (20%) out of 5 alpacas in this herd, although all 5 animals had direct contact to each other.

Six house mice (*Mus musculus*) were trapped at this alpaca herd (see Table 3). None of these mice was positive for CPXV-specific antibodies or DNA. Out of five cats, living on the farm with supposed close contact to the alpacas, one animal was sampled, but did not show CPXV-specific antibodies or clinical symptoms.

#### 3.2. Virus Isolation, Sequence, and Phylogenetic Analyses

Skin crust materials previously tested positive for CPXV DNA were used to generate virus isolates originating from alpacas and cat (Tables 2 and 3). In addition, a common vole isolate was achieved with direct relation to the affected alpaca herd III using material of the vole's conchae (Table 3).

For phylogenetic analysis of the isolated virus strains, the sequences of the HA gene and the complete genomes were generated. Clearly, virus isolates from the local outbreaks cluster together irrespective of the host species (Figure 2). To confirm similarity of the common vole *FM Eimka* origin isolate to the alpaca isolate (CPXV Ger/2017/Alpaca Index-Saxony), the whole genome of *FM Eimka* was generated. Interestingly, the similarity value of these isolates from the same location scored 99.997%. CPXV strains isolated from two alpacas of the same herd, but different time points (e.g., CPXV Ger/2013/Alpaca Index-Saxony-Anhalt and CPXV Ger/2013/Alpaca/DK13/13) exhibited 100% sequence similarity of the HA gene (Figure 2). Phylogenetic clustering was generally supported by high bootstrap values (Figure 2).



**Figure 2.** Evolutionary relationship of taxa based on the nucleotide sequence of the hemagglutinin gene. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method [37]. The optimal tree with the sum of branch length = 0.99468564 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown at the bifurcations [38]. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method [39] and are in the units of the number of base substitutions per site. The analysis involved 23 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There was a total of 629 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 [36]. Abbreviations used are: CPXV, cowpox virus; MPXV, monkeypox virus; VACV, vaccinia virus; VARV, variola virus. Novel sequences generated in this study are indicated by black circles. White diamonds show CPXV isolates from alpacas previously fully sequenced [12].

In order to further verify the genetic identity of CPXV within each herd, a second locus (CPXV048, which is the VACV F1L gene homologue) was successfully amplified [35], sequenced, and subjected to phylogenetic analyses. Although the overall topology in this tree was slightly different, the clustering of CPXV sequences within each herd was identical as to that of the HA tree (See Figure S1).



#### 4. Discussion

In an interval of five years, four separate outbreaks of CPXV infection occurred in four unrelated alpaca herds situated in Eastern Germany. Prior to these, CPXV infection has only been described twice in SACs in Europe [28,30]. These repetitious outbreaks of infection in alpacas needed to be clearly scrutinized by comparing these four clusters and trying to identify epidemiologic markers.

Starting with analysis of the husbandry systems and nutrition, similarities in all four herds were obvious: open stabling with direct open access to pasture except during winter was the preferred method of rearing. The animals were mostly held in flocks with segregation of sexes, and they were fed by grass, hay, and concentrated and mineral feed. Straw was used as litter in the stables. Usually there was one central stockyard for the storage of hay and straw; mineral and concentrated feed is kept in capped buckets or tons.

Considering the seasonality of their outcome, three outbreaks (herd II, III, and IV) occurred in winter and early spring (January till May), whereas one outbreak (herd I) occurred in summer (June till September). Compared to other animal species, this is rather contrary to descriptions in cats [13,23–25], where the majority of cases are described in late summer and autumn with a peak in August and September. On the other hand, our findings match the seasonality described for zoo animals [17,40], with CPXV outbreaks occurring in winter (January till March) as well. A likely explanation might be, that rodents (as reservoir hosts) seek immediate proximity to the alpaca stables in winter, because of alimentary and thermal benefits. Thus, the chance for alpacas to come into contact to contaminated fodder by CPXV-infected rodent feces and urine might be higher.

To confirm the involvement of wild rodents as reservoir hosts also in alpaca-associated CPXV outbreaks, trapping of small mammals was successfully performed in all four alpaca herds. In two out of four alpaca herds (herds I and II) a certain number of trapped rodents were found seropositive for CPXV-specific antibodies. Though several species were trapped, in each case, the seropositive rodents belonged to a single species. In Thuringia, they were striped field mice and in Saxony-Anhalt they were bank voles. In accordance to detailed investigations on wild rodents [17,20–22,41], these two species are identified as putative reservoir hosts for CPXV in nature. It remains unclear why none of the trapped rodents at the other two herds (Saxony and Brandenburg) were found seropositive for CPXV-specific antibodies. Especially considering that there was one single common vole in herd III, in which the detection of CPXV-specific DNA and the isolation of CPXV was possible, and a comparatively high number of trapped voles there. However, the CPXV positive vole reveals the presence of CPXV in the environment of herd III, as do the seropositive rodents in herds I and II, and the CPXV-infected cat at the neighborhood of herd II. The fact that none of the trapped wild rodents nor the cat in herd IV were seropositive, suggests that CPXV does not circulate extensively in the environment of this herd. Interestingly, all these rodents were house mice, previously not known to be naturally infected with CPXV. Nevertheless, our study provides evidence that voles are putative reservoir hosts of CPXV, and it was again a common vole from which CPXV could be isolated [12]. To the best of our knowledge, common voles are the only natural rodent host species giving rise to CPXV isolates thus far [12,18]. Because of the few CPXV isolates from rodents, it is purely speculative whether common voles shed more (and/or longer) virus than other rodent species, or their life history and preferred habitat is more suitable to the open stabling and pasture feeding commonly used for alpaca herds, or it is simply a coincidence. Rats (*Rattus norvegicus*) are also well known natural hosts for CPXV [11,17], but they were not trapped in our study. The complete genomes of the two CPXV isolates from accidental host (alpaca) and reservoir host (common vole) in herd III were almost 100% identical. This provides further strong evidence for the common vole being the source of the CPXV infection of the alpacas. Here, we assume that the infection route was drinking the water contaminated by the infected vole that was drowned in the water bucket.

Despite the differences that existed between the herds, it should be emphasized that sequences of CPXV were identical within the herds, regardless of whether they originated from an alpaca, a cat, or a vole. This could be demonstrated for herds II and III where three sequences were generated for each.

This geographical sequence identity was found for the HA and the F1L homologue gene analyses as well as for the full genome comparison of the vole isolate with the alpaca isolate from the same herd, indicating circulation of a single local CPXV strain. This is further supported by the observation of the owner of herd III who witnessed a drowned rodent in the water bucket shortly before the index case. Sequence identity over the full genome range was almost 100% for the index case and the vole which experienced the same fate more than two months later.

By having a look on the course of infection through the alpaca herds, in all four herds, infection began to appear in one single flock and distributed later among other flocks in two herds. Herd III exhibited more exemplary infection courses and possible ways of transmission. Likely, virus entered the herd by initially infecting one individual through water or fodder contaminated by infectious rodent feces or urine. This theory was nicely affirmed by the CPXV-infected common vole in the water bucket of flock 3. Serology data reveal that after one animal got infected in flock 3, sequentially, all other animals of this flock had seroconverted. The virus was meanwhile also transmitted to the mare flock and one by one the animals seroconverted. As alpacas are so called “distance animals”, avoiding close contact to each other and not performing pair grooming [2,3], direct animal contact as way of virus transmission does not seem obvious (only in case of biting each other, as stallions do while fighting, or in the case of spitting on each other). The fact that none of the stallions of flock 2, which could have direct animal contact to the stallions of flock 3 through the fence, showed positive serology results, supports this. Typical comfort behaviors of SACs are scraping themselves against items in the direct environment (brooms, wood, etc.) and wallowing in the sand [3]. In addition, animals of one flock use the same water bucket and fodder racks; there was a CPXV DNA-positive tested broom in the stable of flock 1, so virus transmission through indirect contact appears to be very likely. As infectious crusts of pox lesions have a high tenacity in the environment [42], indirect transmission, whether by alpaca-associated utensils, by fodder (hay and straw), or maybe also through contact to humans might be possible for a certain time. While these scenarios fit well to the situations in herds I and II, there is no reasonable answer why only one alpaca mare in herd IV got infected and how it became infected.

Interestingly, despite all similarities in the alpaca herds, the dynamic of CPXV infections are diverse. Only one out of five animals in herd IV was infected versus 13 infected out of 16 animals in herd III. This fact raises the question, why does herd III differ from the others? Three herds (herds I, II, and IV) were situated in landscapes that contain mostly plains with fields or pastures and wooden areas close by, only herd III was situated in a valley with the herd property ranging uphill and wooden areas close by. In this herd, rodent holes and burrows were numerous and easy to see on the pastures, and the quantity of trapped rodents was very high. Compared to the other herds, this herd contained the highest quantity of old animals (>10 years of age) emphasizing a possibly higher susceptibility for pathogens in general. Individual health status of the animals is certainly contributing to symptomatic or asymptomatic disease progress [43,44].

CPXV infection as a zoonotic disease always comprises the potential of transmission to humans, especially considering SACs are becoming more and more popular as pets and as animals for animal-assisted therapy or recreational activities like trekking. Although SACs, by their nature, avoid direct contact to other animals as well as to humans, contact with them or with animal-associated utensils while handling or working with them is unavoidable. Our investigations confirm that in a CPXV-infected alpaca, virus is detectable in both various pox lesions (conjunctiva, oral, and nasal mucous membrane, skin) and feces, and that crusts are infectious for at least four weeks. Most of the pox lesions are located on the head, and because of their thick fleece, especially in winter, those can easily be overlooked. As an increasing part of human population is vulnerable for CPXV after termination of cross-protective smallpox vaccination [45], holders of SACs and veterinarians should be aware of CPXV infection as a potential differential diagnosis for symptoms like single, multifocal, or diffuse lesions of the skin or mucous membranes. Cowpox suspicious animals should immediately be separated from the other animals and swab samples and crusts of suspicious pox lesions should be

tested. Once CPXV is diagnosed, it is highly recommended to prevent direct human contact (use of disposable gloves) and any animal transfer until the animals test negative for CPXV. Additionally, strict hygiene and disinfection management should be performed among the entire herd before ending quarantine measures. As the husbandry system of alpacas allows continuous contact to wild rodents and voles in particular, a ubiquitous reservoir host of CPXV, virus entry into alpaca herds may be possible at any time, and protective measures, e.g., vaccination of alpacas, might be considered in general.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/1999-4915/9/11/344/s1](http://www.mdpi.com/1999-4915/9/11/344/s1).

**Acknowledgments:** We want to thank the holders of the four alpaca herds for their disposition and support for our herd investigations. In addition, we want to thank Anne Kretschmar, Adéla Černá and Josepha Hermann for supporting the herd investigations, as well as Sarah Hübner (Veterinary practice Winter & Potrykus, Doberlug-Kirchhain) for supporting the herd investigations in herd IV and for delivering trapped rodents to the institute, and Andrea Konrath (Landesuntersuchungsanstalt Sachsen, Standort Leipzig) for providing CPXV isolates. We acknowledge Annekathrin Ruhland, Dörte Kaufmann, Doris Junghans, Mareen Lange, Saskia Weber and Dietlinde Woll for their excellent technical assistance and René Ryll, Maysaa Dafalla, Stephan Drewes und Beate Matzkeit for supporting the dissections. The study was partially funded by the German Research Foundation SPP1596 project BE5187 awarded to Martin Beer. Almut Prkno was funded by a scholarship (funding No. WEV-R-A09-02-1116) of the University of Leipzig and the Saxon State Ministry for Science and the Arts.

**Author Contributions:** Almut Prkno, Daniela Goerigk, Matthias Kaiser, Alexander Starke, Martin Pfeffer, and Thomas W. Vahlenkamp conceived and designed the procedure of the investigations in the alpaca herds; Daniela Goerigk performed the investigations in alpaca herds I and II; Almut Prkno and Matthias Kaiser performed the investigations in alpaca herds III and IV; Anne Catherine Franscisca van Maanen and Martin Pfeffer conceived and performed the investigations on rodents in alpaca herds I and II; Donata Hoffmann and Martin Beer performed all virological and molecular biological investigations; Maria Jenckel generated whole genome sequencing data; Florian Pfaff annotated and curated whole genome sequencing data; Kathrin Jeske and Rainer G. Ulrich coordinated all small mammal necropsies and taxonomic allocations; Almut Prkno, Martin Pfeffer, Donata Hoffmann, and Rainer G. Ulrich analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript; Almut Prkno and Donata Hoffmann contributed equally to this study; all authors approved the manuscript before submission.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Gauly, M.; Vaughan, J.; Cebra, C. (Eds.) *Neuweltkameliden: Haltung, Zucht, Erkrankungen; 30 Tabellen*, 3rd ed.; Enke: Stuttgart, Germany, 2011.
2. Ade, C. *Freizeitpaß mit Lamas und Alpakas*; Ulmer: Stuttgart, Germany, 2015.
3. Boyle, C.; Isenbügel, E. *Lamas und Alpakas in der Pädagogischen Förderung von Kindern und Jugendlichen*, 2nd ed.; Reinhardt: München, Germany, 2015.
4. Halsby, K.; Twomey, D.F.; Featherstone, C.; Foster, A.; Walsh, A.; Hewitt, K.; Morgan, D. Zoonotic diseases in South American camelids in England and Wales. *Epidemiol. Infect.* **2017**, *145*, 1037–1043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Jacobsen, B.; Algermissen, D.; Schaudien, D.; Venner, M.; Herzog, S.; Wentz, E.; Hewicker-Trautwein, M.; Baumgärtner, W.; Herden, C. Borna disease in an adult alpaca stallion (*Lama pacos*). *J. Comp. Pathol.* **2010**, *143*, 203–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kapil, S.; Yeary, T.; Evermann, J.F. Viral diseases of new world camelids. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2009**, *25*, 323–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Schulz, C.; Beer, M.; Hoffmann, B. Schmallenberg virus infection in South American camelids: Field and experimental investigations. *Vet. Microbiol.* **2015**, *180*, 171–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Schulz, C.; Eschbaumer, M.; Ziller, M.; Wäckerlin, R.; Beer, M.; Gauly, M.; Grevelding, C.G.; Hoffmann, B.; Bauer, C. Cross-sectional study of bluetongue virus serotype 8 infection in South American camelids in Germany (2008/2009). *Vet. Microbiol.* **2012**, *160*, 35–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Wallace, R.M.; Niezgoda, M.; Waggoner, E.A.; Blanton, J.D.; Radcliffe, R.A. Serologic response in eight alpacas vaccinated by extralabel use of a large animal rabies vaccine during a public health response to a rabid alpaca in South Carolina. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2016**, *249*, 678–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Wernery, U.; Kaaden, O.-R. Foot-and-mouth disease in camelids: A review. *Vet. J.* **2004**, *168*, 134–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. Essbauer, S.; Pfeffer, M.; Meyer, H. Zoonotic poxviruses. *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 229–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Franke, A.; Pfaff, F.; Jenckel, M.; Hoffmann, B.; Höper, D.; Antwerpen, M.; Meyer, H.; Beer, M.; Hoffmann, D. Classification of cowpox viruses into several distinct clades and identification of a novel lineage. *Viruses* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bennett, M.; Gaskell, C.J.; Baxby, D.; Gaskell, R.M.; Kelly, D.F.; Naidoo, J. Feline cowpox virus infection. *J. Small Anim. Pract.* **1990**, *31*, 167–173. [[CrossRef](#)]
14. Jäger, K.; Steinborn, P.; Weider, K.; Wohlsein, P. Kutane Infektion mit Orthopoxvirus bovis bei einem Wachtelhund. *Tierärztliche Praxis* **2016**, *44*, 273–277. [[PubMed](#)]
15. Pfeffer, M.; Burck, G.; Meyer, H. Kuhpockenviren in deutschland: Eine analyse von 5 Fällen aus dem Jahr 1998. *Berliner Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **1999**, *112*, 334–338.
16. Scarff, D. Cowpox (orthopox virus) in the cat. *Companion Anim.* **2012**, *17*, 36–38. [[CrossRef](#)]
17. Pilaski, J.; Jacoby, F. Die Kuhpocken-Erkrankungen der Zootiere. *Verh. ber. Erkr. Zootiere* **1993**, *35*, 39–50.
18. Hoffmann, D.; Franke, A.; Jenckel, M.; Tamošiūnaitė, A.; Schluckebier, J.; Granzow, H.; Hoffmann, B.; Fischer, S.; Ulrich, R.G.; Höper, D.; et al. Out of the reservoir: Phenotypic and genotypic characterization of a novel cowpox virus isolated from a common vole. *J. Virol.* **2015**, *89*, 10959–10969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Chantrey, J.; Meyer, H.; Baxby, D.; Begon, M.; Bown, K.J.; Hazel, S.M.; Jones, T.; Montgomery, W.I.; Bennett, M. Cowpox: Reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol. Infect.* **1999**, *122*, 455–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Essbauer, S.; Hartnack, S.; Misztela, K.; Kiessling-Tsalos, J.; Bäuml, W.; Pfeffer, M. Patterns of orthopox virus wild rodent hosts in South Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2009**, *9*, 301–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Hazel, S.M.; Bennett, M.; Chantrey, J.; Bown, K.; Cavanagh, R.; Jones, T.R.; Baxby, D.; Begon, M. A longitudinal study of an endemic disease in its wildlife reservoir: Cowpox and wild rodents. *Epidemiol. Infect.* **2000**, *124*, 551–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kinnunen, P.M.; Henttonen, H.; Hoffmann, B.; Kallio, E.R.; Korthase, C.; Laakkonen, J.; Niemimaa, J.; Palva, A.; Schlegel, M.; Ali, H.S.; et al. Orthopox virus infections in Eurasian wild rodents. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 1133–1140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Appl, C.; von Bomhard, W.; Hanczaruk, M.; Meyer, H.; Bettenay, S.; Mueller, R. Feline cowpoxvirus infections in Germany: Clinical and epidemiological aspects. *Berliner Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **2013**, *126*, 55–61.
24. Bennett, M.; Gaskell, C.J.; Gaskell, R.M.; Baxby, D.; Gruffydd-Jones, T.J. Poxvirus infection in the domestic cat: Some clinical and epidemiological observations. *Vet. Rec.* **1986**, *118*, 387–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Pfeffer, M.; Kaaden, O.-R.; Pfleghaar, S.; von Bomhard, D.; Meyer, H. Retrospective investigation of feline cowpox in Germany. *Vet. Rec.* **2002**, *150*, 50–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Franke, A.; Kershaw, O.; Jenckel, M.; König, L.; Beer, M.; Hoffmann, B.; Hoffmann, D. Fatal cowpox virus infection in an aborted foal. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2016**, *16*, 431–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Pilaski, J.; von Witzendorff, P.; Brandt, H.-P.; Höhr, D. Ein Pockenausbruch bei Elefanten (*Elephas maximus*, *Loxodonta africans*) in einem Wanderzirkus während des Aufenthaltes im Winterquartier. *Verh. ber. Erkr. Zootiere* **1995**, *37*, 357–363.
28. Cardeti, G.; Brozzi, A.; Eleni, C.; Polici, N.; D’Alterio, G.; Carletti, F.; Scicluna, M.T.; Castiletti, C.; Capobianchi, M.R.; di Caro, A.; et al. Cowpox virus in Llama, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 1513–1515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Goerigk, D.; Theuß, T.; Pfeffer, M.; Konrath, A.; Kalthoff, D.; Woll, D.; Vahlenkamp, T.W.; Beer, M.; Starke, A. Kuhpockenvirusinfektion bei einem Alpaka (*Vicugna pacos*)—Klinische Symptomatik, Diagnostik und pathologische Befunde. *Tierärztliche Praxis* **2014**, *42*, 169–177. [[PubMed](#)]
30. Schüppel, K.-F.; Menger, S.; Eulenberger, K.; Bernhard, A.; Pilaski, J. Kuhpockeninfektion bei Alpakas (*Lama Glama pacos*). *Verh. ber. Erkr. Zootiere* **1997**, *38*, 259–265.
31. Baumgartner, W.; Ketz Riley, C.J. *Klinische Propädeutik der Inneren Krankheiten und Hautkrankheiten der Haus- und Heimtiere: Mit 35 Tabellen*, 5th ed.; Parey: Berlin, Germany, 2002.
32. Fowler, M.E.; Bravo, P.W. *Medicine and Surgery of Camelids: [Llama, Alpaca, Vicuña, Guanaco, Dromedary & Bactrian Camels]*, 3rd ed.; Wiley-Blackwell: Ames, IA, USA, 2010.
33. Schlegel, M.; Ali, H.S.; Stieger, N.; Groschup, M.H.; Wolf, R.; Ulrich, R.G. Molecular identification of small mammal species using novel cytochrome B gene-derived degenerated primers. *Biochem. Genet.* **2012**, *50*, 440–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



34. Maksyutov, R.A.; Gavrilova, E.V.; Meyer, H.; Shchelkunov, S.N. Real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J. Virol. Methods* **2015**, *211*, 8–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kalthoff, D.; Bock, W.-I.; Hühn, F.; Beer, M.; Hoffmann, B. Fatal cowpox virus infection in Cotton-Top Tamarins (*Saguinus oedipus*) in Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2014**, *14*, 303–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 2725–2729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Saitou, N.; Nei, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, 406–425. [[PubMed](#)]
38. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **1985**, *39*, 783–791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Tamura, K.; Nei, M.; Kumar, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11030–11035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Kurth, A.; Straube, M.; Kuczka, A.; Dunsche, A.J.; Meyer, H.; Nitsche, A. Cowpox virus outbreak in banded mongooses (*Mungos mungo*) and jaguarundis (*Herpailurus yagouaroundi*) with a time-delayed infection to humans. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Oldal, M.; Sironen, T.; Henttonen, H.; Vapalahti, O.; Madai, M.; Horváth, G.; Dallos, B.; Kutas, A.; Földes, F.; Kemenesi, G.; et al. Serologic survey of orthopoxvirus infection among rodents in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2015**, *15*, 317–322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Essbauer, S.; Meyer, H.; Porsch-Ozcürümez, M.; Pfeffer, M. Long-lasting stability of vaccinia virus (*Orthopoxvirus*) in food and environmental samples. *Zoonoses Public Health* **2007**, *54*, 118–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Fassbender, P.; Zange, S.; Ibrahim, S.; Zoeller, G.; Herbstreit, F.; Meyer, H. Generalized cowpox virus infection in a patient with HIV, Germany, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 553–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Gazzani, P.; Gach, J.E.; Colmenero, I.; Martin, J.; Morton, H.; Brown, K.; Milford, D.V. Fatal disseminated cowpox virus infection in an adolescent renal transplant recipient. *Pediatr. Nephrol.* **2017**, *32*, 533–536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Vorou, R.M.; Papavassiliou, V.G.; Pierrousakos, I.N. Cowpox virus infection: An emerging health threat. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2008**, *21*, 153–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 5 Publikation 3

### Field trial vaccination against cowpox in two alpaca herds

Almut Prkno, Donata Hoffmann, Matthias Kaiser, Daniela Goerigk, Martin Pfeffer, Karsten Winter, Thomas W. Vahlenkamp, Martin Beer, Alexander Starke

Viruses. 2020;12(2)

DOI: 10.3390/v12020234

Almut Prkno war maßgeblich in die Konzeptentwicklung, die Studienplanung und -durchführung einbezogen. Sie war für die Durchführung der praktischen Tätigkeiten in den Alpakaherden verantwortlich und hat diese mit Unterstützung von Daniela Goerigk und Matthias Kaiser durchgeführt. Almut Prkno führte die Aufbereitung der erhobenen Daten selbstständig durch und analysierte und interpretierte mit Unterstützung von Martin Pfeffer, Donata Hoffmann und Alexander Starke die Ergebnisse. Almut Prkno war für die Begutachtung der Literatur verantwortlich und federführend bei der Erstellung des Manuskriptes für diese Publikation.

## Article

# Field Trial Vaccination against Cowpox in Two Alpaca Herds

Almut Prkno <sup>1,†,\*</sup>, Donata Hoffmann <sup>2,†</sup> , Matthias Kaiser <sup>1</sup>, Daniela Goerigk <sup>3</sup>, Martin Pfeffer <sup>4</sup> , Karsten Winter <sup>5</sup>, Thomas W. Vahlenkamp <sup>6</sup>, Martin Beer <sup>2</sup> and Alexander Starke <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Clinic for Ruminants and Swine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 11, 04103 Leipzig, Germany; mkaiser@vetmed.uni-leipzig.de (M.K.); alexander.starke@vetmed.uni-leipzig.de (A.S.)

<sup>2</sup> Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Germany; Donata.Hoffmann@fli.de (D.H.); Martin.Beer@fli.de (M.B.)

<sup>3</sup> Veterinary practice Dr. Daniela Goerigk, Naundorfer Str. 9, 04668 Schkortitz, Germany; info@tierarzt-goerigk.de

<sup>4</sup> Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Centre for Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany; pfeffer@vetmed.uni-leipzig.de

<sup>5</sup> Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Leipzig, Liebigstraße 13, 04103 Leipzig, Germany; kwinter@rz.uni-leipzig.de

<sup>6</sup> Institute of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 29, 04103 Leipzig, Germany; vahlenkamp@vetmed.uni-leipzig.de

\* Correspondence: ap81weru@studserv.uni-leipzig.de; Tel.: +49-341-9738331

† These authors contributed equally to this work.

Received: 27 January 2020; Accepted: 17 February 2020; Published: 20 February 2020



**Abstract:** In Europe, cowpox virus (CPXV) infection in South American camelids occurs as a so-called spill-over infection. Although infected animals generally have a mild form of the disease and survive, cases of fatal generalised CPXV infection have also been described. Prevention by prophylactic vaccination is the only way to protect animals from disease. In the present study, modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccine, which has been successfully used in many animal species, was used in a prime-boost vaccination regimen in two alpaca herds with a history of CPXV infection. The focus of the study was the prevention of further clinical cases, and to determine the safety and immunogenicity of the MVA vaccine in alpacas. The MVA vaccine was well tolerated and safe in the 94 animals vaccinated. An indirect immunofluorescence assay (IFA) using MVA as an antigen showed that the seroprevalence of antibody after booster vaccination was 81.3% in herd I and 91.7% in herd II. Detectable antibody titres declined to 15.6% in herd I and 45.8% in herd II over a 12-month period after booster vaccination. Animals could be divided into four groups based on individual antibody titres determined over one year: Group 1 consisted of 19.3% of animals that were seropositive until the end of the trial period; Group 2 consisted of 58.0% of animals that were seropositive after booster vaccination, but seronegative one year later; Group 3 consisted of 14.7% of animals that were not seropositive at any time point; and Group 4 consisted of 7.9% of animals that were seropositive after initial immunisation, seronegative six months later, but seropositive or intermediate in IFA one year after immunisation, likely because of natural exposure. In new-born crias born to MVA-vaccinated mares, specific maternal antibodies were detected in 50.0% of animals up to 14 weeks of age. Our results confirm that MVA vaccination is a feasible tool for the prevention of CPXV disease in alpacas. Long-term studies are needed to verify future vaccination regimen in CPXV affected herds.

**Keywords:** alpaca; South American camelids; cowpox; prevention; vaccination; MVA

---

## 1. Introduction

Cowpox is a disease caused by the cowpox virus (CPXV), a member of the genus *Orthopoxvirus* (OPV), family *Poxviridae* [1]. Being endemic in Eurasia, a number of animal species have been shown to be naturally susceptible to CPXV [1]. In addition, certain non-native animal species, kept in zoos or other animal holdings, are also susceptible to CPXV infections. Examples include African rhinoceroses and elephants [2–6] as well as jaguarundis, giant anteaters, ocelots, Patagonian caviars and New World monkeys [7–11]. CPXV infection in South American camelids (SACs) was first described in 1997 [12], and since then, only a few reports of CPXV infection in SACs have been published [13–17]. CPXV infections in SACs occur sporadically. Reservoir hosts (i.e., circulation of the pathogen within a population) of CPXV are likely wild rodents (bank voles, common voles and striped field mice) and virus transmission through indirect contact is probably the most common route of transmission. Infection of SACs with CPXV leads to two different disease presentations: mild, mostly self-limiting infections with localised skin lesions (pustules and crusts), and generalised, frequently lethal infections with multifocal to diffuse skin lesions (papules, pustules, crusts, ulcers) accompanied by virus replication in other organs. Although llamas and alpacas are an established species of livestock and pets in Europe, there are currently no data on the incidence of CPXV infection in SACs.

Research on antiviral agents, such as cidofovir, brincidofovir (CMX001) and tecovirimat (ST-246), for the treatment of OPV infections is ongoing [18–22]. However, to the authors' knowledge, there is currently no approved treatment for CPXV infection in animals. Thus, prevention via prophylactic vaccination is the only feasible approach to manage CPXV diseases, especially in valuable and highly susceptible animals (e.g., elephants and other zoo animals).

It is well established that each species of the genus OPV induces cross-reactive antibodies, which provide immunoprotection against infection with other species of OPV [1]. Therefore, prophylactic vaccination remains an important tool in the prevention of diseases caused by orthopoxviruses. One of the best examples is the World Health Organization's global campaign to eradicate human smallpox, which is caused by variola virus, using the vaccinia virus vaccine. Different vaccine strains of vaccinia virus were available for this campaign [23]; the strain Elstree was used in Germany [24]. At the end of this campaign (1972–1980), another virus strain called modified vaccinia virus Ankara (MVA) was licensed in Germany as part of the official smallpox vaccination program for humans [25].

MVA is a highly attenuated strain originating from a virulent vaccinia virus strain called chorioallantois vaccinia virus Ankara. It was developed by Mayr and colleagues in the 1960s and 1970s [24,25] through more than 500 passages of chorioallantois vaccinia virus Ankara in chicken embryo fibroblasts. This resulted in six large deletions within the terminal genome fragments leading to an overall reduction of the genome length from 208 to 178 kilo base pairs. By the 530th passage in chicken embryo fibroblasts, the strain was called MVA. Genes that are affected by deletion regulate host interaction and the production of A-type inclusion bodies. Attenuations lead to a greatly restricted host range and the inability of the virus to complete replication cycles in mammalian cells [25,26]. In humans, the MVA vaccine is avirulent, non-contagious and well tolerated, which renders it safe for use in immunosuppressed individuals [27,28]. In 2013, Imvanex (Bavarian Nordic A/S), the only licensed MVA vaccine in Europe, was approved by the European Medicines Agency to vaccinate humans against smallpox infection [29]. In addition, this vaccine was used off-label for pre- and post-exposure prophylaxis in humans with monkeypox virus infection in the United Kingdom [30].

The MVA-based vaccine is also used to protect animals from CPXV-induced disease and has been primarily described in elephants [25,31] but also in mice, domestic cats, rabbits and other zoo animals [9,25,32–34]. By German law, this vaccine requires a special exemption issued by the appropriate Ministries of the Federal States.

The use of MVA vaccine in alpacas or llamas has not been described so far. The economic value of these animals and the zoonotic potential of CPXV infection justify determination of whether MVA vaccine is effective for the prevention of CPXV-induced disease in SACs. The present study describes the application of the MVA vaccine in a prime-boost immunisation regimen in two alpaca herds in Germany with a history of CPXV infections [16]. The aim of the present study was to assess the safety of a live MVA vaccine in alpacas and to determine its immunogenicity after initial immunisation and one year later.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Alpaca Herds

The study included a total of 102 alpacas (35 males, 67 females) that varied in age and originated from two privately owned herds (herd I – Thuringia,  $n = 69$ ; herd II – Saxony Anhalt,  $n = 33$ ) in Germany. The owners of each herd had divided the animals into gender-specific groups, which had no effect on the study. The husbandry systems used were perennial open housing (herd I) and a combination of pasture feeding in the summer and open housing in the winter (herd II). No other farm or companion animals were kept on either of the farms.

### 2.2. Herd History

In both herds, clusters of CPXV infection occurred and were confirmed by determining CPXV-specific antibody titres and CPXV-specific DNA, as described by [16]. Herd seroprevalences of 16.4% (herd I) and 16.1% (herd II) were determined at that time. To prevent further cases of CPXV infection, MVA vaccination was considered to be the best option. There was a period of 13 months (herd I) and three months (herd II) between the last herd investigation [16] and the start of MVA vaccination. A total of 69 animals (64 adults and 5 crias) of herd I and 33 animals (24 adults and 9 crias) of herd II were used in the present study. This included seven animals of herd I (IDs 101, 103, 138, 139, 145, 165 and 166) and two animals of herd II (IDs 12 and 16) that tested positive for CPXV-specific antibody in dilutions ranging from 1:200 to 1:500 [16]. CPXV-specific antibody titres determined in previous studies were henceforth referred to as ‘pre-existing field titres’ (Table S1).

### 2.3. MVA Vaccination

A total of 94 of 102 animals (herd I –  $n = 64$ ; herd II –  $n = 30$ ; 8 animals had not been born at that time) were vaccinated with the MVA vaccine ‘MVA F6 LMU SF 12-9<sup>1</sup> ( $>10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL in chicken embryo fibroblasts) provided by the Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig Maximilians University München, Munich, Germany (Table 1). A special exemption was obtained from the relevant Ministries of the Federal States (herd I: Thuringian Ministry of Labour, Social Welfare, Health, Woman and Family Affairs - permit-number: 51-2511/90-1-33743/2013, July 15, 2013; herd II: Ministry of Environment, Agriculture and Energy of Saxony-Anhalt – permit-number: 65-42114/1, May 25, 2013) under German law (Animal Health Act Sect. 11 para. 5 Nb 1). Animals were vaccinated subcutaneously on the right side of the neck, cranial to the scapula, and a booster vaccination was administered four weeks later at the same location. A 2.0 mL aliquot of vaccine was used in adult alpacas and 1.0 mL of vaccine was used in crias (up to six months of age). The route of administration and volume of vaccine were chosen according to the vaccine’s batch record and reports in other animal species [24,25].

**Table 1.** Field trial vaccination against cowpox in two alpaca herds Germany: MVA vaccination regimen and sampling information.

Time Points	1 (Day Zero)	2 (+1 Mo)	3 (+1 Mo)	4 (+5 Mo)	5 (+6 Mo)
Vaccination	×	×	—	—	—
Adverse reaction	—	×	×	—	—
Clinical examination	×	×	×	×	×
Serum sample (antibody testing)	—	×	×	×	×
Swab sample (viral DNA)	—	×	×	×	×

× done/sampled; — not done/sampled; mo, months; MVA, modified vaccinia virus Ankara.

#### 2.4. Sampling

Four weeks after the initial and booster vaccinations, 88 animals underwent clinical examination as described by [16], were checked for vaccine reactions and had a jugular blood sample and a swab of the oral mucous membranes collected as described by ([16], Table 1). Jugular blood samples and an oral swab were again collected six and 12 months after the booster vaccination in all animals.

To determine the presence of specific serum maternal antibodies (maAbs), a jugular blood sample was collected two to 12 weeks after birth in 14 crias born to dams that had been vaccinated with MVA before or during pregnancy. Crias ( $n = 6$ ) born at the start of the study between time points 1 and 3 were vaccinated twice with MVA vaccine, immediately after initial blood sampling and four weeks later (outside the time points outlined in Table 1). At the time of booster vaccination, possible vaccine reactions were recorded, and a jugular blood sample was collected. These crias were again sampled at time points 4 and 5 (Table 1) together with the adult herd. Crias ( $n = 8$ ) born near the end of the study between time points 4 and 5 were not vaccinated with MVA vaccine because special permission for the vaccine had expired. Five of these crias were sampled for the second time at time point 5 together with the adult herd and the remaining three were sampled for the first time at time point 5.

#### 2.5. Diagnostic Methods

To determine the safety of the MVA vaccine in alpacas, a scoring system described by [35] was used to classify adverse reactions. Four weeks after each immunisation, the owners were interviewed regarding score K, which denoted general signs of illness including fever, anorexia and listlessness in the week following immunisation. Score A described abscess formation at the injection site. At the same time, chronic localized dermal swelling was measured using a Vernier calliper (MarCal 16 DN Messschieber mit Skalenanzeige, Mahr GmbH, Göttingen, Germany) and scored based on diameter (0, no reaction; 1,  $\leq 2$  cm; 2,  $> 2$  cm and  $< 5$  cm; 3,  $\geq 5$  cm).

An indirect immunofluorescence assay (IFA) using endpoint dilution was carried out to detect specific antibodies in sera of vaccinated alpacas and new-born crias. Briefly, MVA-infected BHK21 cells (Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine, Friedrich-Loeffler-Institute, Greifswald-Insel Riems, Germany) and non-infected control cells were incubated with diluted alpaca serum after fixation using a methanol/acetone protocol. After incubation for one hour at room temperature, cells were washed with phosphate-buffered saline, and a FITC-labelled secondary antibody (Bethyl laboratories, Montgomery, Texas, US) was applied for one hour at room temperature. The cells were washed, and immunofluorescence microscopy was used to detect primary antibody binding. Each IFA was validated by the use of reference alpaca sera. In animals with inconclusive antibody results, a second IFA based on CPXV-infected cell cultures was done as previously described [16,36]. Generally, sera scored positive only after viral plaque-associated staining. Sera were deemed “intermediate” when there was a non-plaque associated reaction pattern. Titres of 200 and greater were considered positive ( $\geq 1:200$ ), sera non-reactive using a 1:200 dilution scored negative ( $< 1:200$ ) and sera reactive with titres between 0 and 200 were considered intermediate ( $> 0 < 1:200$ ). To show antibody titres of individual animals over time (P), results for each time point were expressed with symbols as follows: ‘+’, positive,

‘-’, negative and ‘?’ , intermediate. For statistical analysis, intermediate results were assigned a value of zero. Serum samples collected from alpacas in a previous study [16] were re-tested using IFA (MVA) to confirm the pre-existing titres, which were a response to natural infection. Oral mucosal swab specimens collected from the alpacas were used for quantitative real-time polymerase chain reaction for the detection of OPV-specific DNA as described previously [36,37].

## 2.6. Statistical Analysis

Statistical analysis was done with IBM® SPSS® Statistics (version 22; IBM Corp., Armonk, New York, USA) and Mathematica® (Version 11.3, Wolfram Research Inc., Champaign, IL, USA). Descriptive statistics were calculated, bar charts and line charts were generated, and data were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilk test. Group comparisons were done using t-tests (normal data) and Mann–Whitney U tests (non-normal data). A Fisher’s exact test was used to analyse data in contingency tables. Significance was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

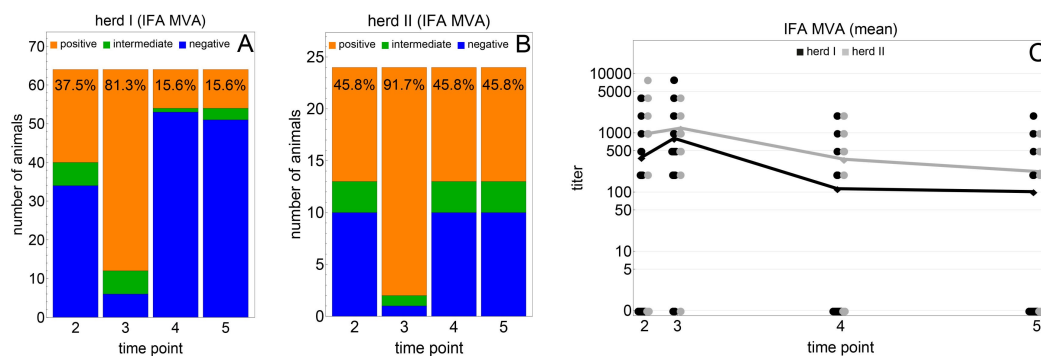
### 3.1. Safety

In herd I, one of 64 animals (1.6%) had a vaccine reaction four weeks after the initial vaccination (time point 2). The vaccine reaction could be seen and palpated as a localised dermal swelling, 3.0 cm in diameter (score 2). There were no vaccine reactions at time point 3, which was four weeks after the booster vaccination.

In herd II, two of 24 animals (8.4%) had a vaccine reaction. The first occurred one day after the initial vaccination (time point 1) and manifested as a localised dermal swelling, 1.0 cm in diameter (score 1). The second was an adverse reaction (score K), which occurred immediately after the initial vaccination and was characterised by anorexia and listlessness for two days. Vaccine reactions did not occur after the booster vaccination.

### 3.2. Immunogenicity

Serological testing showed antibody titres after the first and second vaccinations in both herds (Figure 1 and Table S1).



**Figure 1.** Field trial vaccination against cowpox in two alpaca herds in Germany: Results of indirect immunofluorescence assay (IFA) after immunisation with the MVA (modified vaccinia virus Ankara) vaccine in herd I (A) and herd II (B) and the distribution of MVA-specific IFA titres and mean titres by herd and time point (C). Herd I—Thuringia ( $n = 64$ ); Herd II—Saxony Anhalt ( $n = 24$ ); time point 2—four weeks after initial vaccination, time point 3—four weeks after booster vaccination, time point 4—six months after booster vaccination, time point 5—12 months after booster vaccination; solid dots/short horizontal lines—individual titres (Figure 1C); solid lines—mean titres (Figure 1C).



In herd I, IFA showed detectable antibody titres in 24 of 64 animals (37.5%) four weeks after the initial vaccination (time point 2). Four weeks after the booster vaccination (time point 3), 52 of 64 animals (81.3%) had seroconverted. The number of seropositive animals decreased to 10 of 64 animals (15.6%) six months after the booster vaccination and remained at this level until 12 months after the booster vaccination (Figure 1A). The results of individual animals are shown in Table S1.

In herd II, IFA showed detectable antibody titres in 11 of 24 animals (45.8%), four weeks after the initial vaccination (time point 2). Four weeks after the booster vaccination (time point 3), 22 of 24 animals (91.7%) had seroconverted. The number of seropositive animals decreased to 11 of 24 animals (45.8%), six months after booster vaccination, and remained constant in 11 animals until 12 months after booster vaccination (Figure 1B).

The distribution of MVA-specific titres and the mean titres for each herd and time point are shown in Figure 1C.

The mean titres were similar in both herds during the study. They increased from time point 2 to time point 3 and then declined from time point 3 to time point 4 and decreased further until time point 5. The mean titre curve of herd I was lower than that of herd II at all time points. Significant differences between the two herds occurred at time point 3 ( $U_{(TP3)} = 1058.0$ ;  $p_{(TP3)} = 0.005$ ), time point 4 ( $U_{(TP4)} = 1006.0$ ;  $p_{(TP4)} = 0.003$ ) and time point 5 ( $U_{(TP5)} = 997.5$ ;  $p_{(TP5)} = 0.004$ ), but not at time point 2 ( $U_{(TP2)} = 890.5$ ;  $p_{(TP2)} = 0.193$ ).

Table 2 shows the wide range in antibody titres over time (P) for individual animals. Although there were 18 possible variations (herd I – 15; herd II – 12), these values could be used to divide animals into four groups. Group 1 (P 1) represented the animals ( $n = 17$ ; 19.3%) that had stable positive antibody titres throughout the study. This group included animals with titres of up to 1:8,000, especially early in the study. In addition, there were nine animals (IDs 12, 16, 101, 103, 136, 138, 139, 145 and 166) that had had natural CPXV infection before the start of the study; this was confirmed by determination of either the CPXV-specific antibody titre [16] or the MVA-specific antibody titre (animal ID 136). The remaining eight animals (IDs 1, 2, 3, 15, 17, 20, 25 and 118) had not had natural CPXV infection. Within this group, there were no differences in antibody titre endpoint dilutions between CPXV-naïve and CPXV-exposed animals at any of the four time points ( $U_{(TP2)} = 45.0$ ,  $p_{(TP2)} = 0.423$ ;  $U_{(TP3)} = 46.5$ ,  $p_{(TP3)} = 0.321$ ;  $U_{(TP4)} = 43.5$ ,  $p_{(TP4)} = 0.481$ ;  $U_{(TP5)} = 53.0$ ,  $p_{(TP5)} = 0.114$ ).

**Table 2.** Summary of individual antibody titres over time after prime-boost MVA vaccination against cowpox in alpacas.

Gr		1				2				3				4						
TP	P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	total
2	IFA (MVA)	+	+	−	+	−	?	−	?	−	+	?	−	−	+	−	−	+	?	
3		+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	?	?	−	+	+	+	+	+	
4		+	+	+	−	+	?	?	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	
5		+	?	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	?	?	?
<i>n</i> herd I		8	1		13	1		1	4	20	1	1	5	5	1	1	1		1	64
<i>n</i> herd II		9	1	1			2	1	1	4			1	1		1	1	1		24
<i>n</i> total		17	2	1	13	1	2	2	5	24	1	1	6	6	1	2	2	1	1	88

Gr, group; TP, time point (2—four weeks after initial vaccination, 3—four weeks after booster vaccination, 4—six months after booster vaccination, 5—12 months after booster vaccination); P, individual titre changes; *n*, number of animals; Herd: I—Thuringia; II—Saxony Anhalt; IFA, indirect immunofluorescence assay (+, positive; –, negative; ?, intermediate (>0<1:200, lowest dilution 1:200 tested reactive, but not positive)); MVA, modified vaccinia virus Ankara.

Group 2 (P 2–10) included animals ( $n = 51$ ; 58.0%) that developed positive antibody titres before time point 3. Thereafter, their titres decreased and were negative by time point 5 (except for animal ID 8—P 3). P 2 and P 3 consisted of animals that tested positive at three time points, P 4 and P 5 were animals that tested positive at two time points, and P 6 to P 10 included animals that seroconverted at one time point only. Within group 2, there were individual titres of up to 1:4000. A large number of individual titre changes occurred after P 4 and P 9. Animals of P 4 had seroconverted by time points 2



and 3 with dilutions ranging from 1:200 to 1:500 and 1:200 to 1:2000, respectively. The animals of P 9 had seroconverted only by time point 3, with dilutions ranging from 1:200 to 1:1000. Comparison of the antibody titre endpoint dilutions showed that the animals of group 1 had consistently higher antibody titres than the animals of group 2 at all four time points ( $U_{(TP2)} = 14.5$ ,  $p_{(TP2)} < 0.001$ ;  $U_{(TP3)} = 157.5$ ,  $p_{(TP3)} < 0.001$ ;  $U_{(TP4)} = 20.0$ ,  $p_{(TP4)} < 0.001$ ;  $U_{(TP5)} = 8.5$ ,  $p_{(TP5)} < 0.001$ ).

Group 3 (P 11–13) comprised animals ( $n = 13$ ; 14.7%) in which seroconversion did not occur at any time point in the study. Group 4 (P 14–18) included animals ( $n = 7$ ; 7.9%) that had fluctuations in antibody titres throughout the study. Seroconversion occurred by time point 3 at the latest and dilutions ranged from 1:200 to 1:2000. Titres were negative at time point 4 but were detectable again (positive at 1:200 or intermediate result) at time point 5.

The sera of animals of groups 3 (no seroconversion) and 4 (inconclusive titre changes) underwent additional testing in a second IFA using CPXV as antigen (Table 3). Results showed that four animals in group 3 (IDs 140 and 153–P 12, IDs 151 and 163–P 13) were negative in both the IFA MVA and IFA using CPXV as antigen. Of the seven animals in group 4, one (ID 10–P 15) had inconclusive results in both tests.

**Table 3.** Antibody titre changes using two different indirect immunofluorescence assays in the animals of group 3 (no seroconversion) and 4 (inconclusive titre changes).

Gr		3										4									
TP	P	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
2	IFA (MVA)	?	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3		?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
4		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	ID	149	24	104	115	121	140	153	23	126	127	143	151	163	155	10	152	11	137	6	144
2	IFA (CPXV)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

IFA, indirect immunofluorescence assay (+, positive; –, negative; ?, intermediate (>0<1:200, lowest dilution 1:200 tested reactive, but not positive)); MVA, modified vaccinia virus Ankara; CPXV, cowpox virus; TP, time point (2—four weeks after initial vaccination, 3—four weeks after booster vaccination, 4—six months after booster vaccination, 5—12 months after booster vaccination); Gr, group; P, individual titre changes; ID, animal identity number.

### 3.3. Results of Crias

Of 14 crias (herd I,  $n = 5$ ; herd II,  $n = 9$ ) tested, seven (50.0%; herd I,  $n = 2$ , herd II,  $n = 5$ ) had positive antibody titres ranging from 1:200 to 1:1000 at the time of initial blood sampling in the first weeks of life, indicating the presence of specific serum maternal antibodies (maAbs) to MVA. The age of crias that tested positive for maAbs ranged from 2.9 to 6.6 weeks (Table 4). Cria no. 172 also tested positive (1:200) at 14.1 weeks of age (time point 5) even though it had not received the MVA vaccination. The crias that tested negative for maAbs to MVA had a mean age of  $6.5 \pm 3.1$  weeks, compared with  $4.2 \pm 1.3$  weeks for crias that had maAbs to MVA; however, the difference was not significant ( $t(8) = 1.83$ ;  $p = 0.105$ ). The two groups of crias had the same female-to-male ratios and thus there was no effect of sex ( $p = 1.000$ ; OR = 1.00; 95%CI (lower) = 0.120; 95%CI (upper) = 8.307). There appeared to be a trend toward a positive association between crias with positive maAb titres born to dams with positive antibody titres, whereas crias with no maAb titre to MVA were born to dams with positive or negative antibody titres. There was no effect of titre status of the dam on the maAb titre status of the cria ( $p = 0.070$ ; OR = 0.00; 95%CI (lower) = 0.00; 95%CI (upper) = N/A). There was a trend for a higher maAb titre prevalence in crias born to dams with a short interval between foaling and vaccination, but the difference was not significant ( $p = 0.592$ ; OR = 3.33; 95%CI(lower) = 0.362; 95%CI(upper) = 30.703). Vaccine reactions were not seen in crias ( $n = 6$ ) that were vaccinated with the MVA vaccine after initial blood sampling; these six crias were seronegative at time points 4 and 5.

**Table 4.** Results of antibody testing in 14 crias and their dams as part of a field trial of MVA vaccination of alpacas against cowpox in Germany.

ID	HERD	SEX	AGE *	IFA Initial Sampling	MVA-VAC	IFA TP 5	Titre MARE **	MARE INTERVAL ***
4	II	m	3.3	1:500	+	–	+	<6 mo
5	II	f	3.7	1:500	+	–	+	<6 mo
28	II	f f	5.1	1:200	+	–	+	<6 mo
29	II	m	3	<1:200	+	–	–	<6 mo
30	II	f	2.9	1:1,000	+	–	+	<6 mo
31	II	m	6.6	>0<1:200	+	–	+	<6 mo
38°	II	m	6.6	1:200	–	+	+	>6 mo
39°	II	f	12.3	<1:200	–	–	+	>6 mo
40°	II	m	7.3	>0<1:200	–	?	+	>6 mo
168	I	m	7.6	<1:200	–	–	–	>6 mo
169	I	f f	3.7	<1:200	–	–	–	>6 mo
170	I	f	5.1	<1:200	–	–	–	>6 mo
171	I		3.6	1:500	–	–	+	>6 mo
172	I		4.3	1:1000	–	+	+	>6 mo

ID, animal identity number; Herd: I—Thuringia ( $n = 5$ ); II—Saxony Anhalt ( $n = 9$ ); m, male; f, female; IFA, indirect immunofluorescence assay (+, positive; –, negative; ?, intermediate or as endpoint dilution:  $\geq 1:200$ , positive;  $< 1:200$ , negative;  $> 0 < 1:200$ , intermediate (lowest dilution 1:200 tested reactive, but not positive)); MVA-VAC, MVA vaccination (+, done; – not done); \* age of the cria in weeks at time of initial sampling; \*\* antibody titre status of the mare at the time of birth; \*\*\* time interval between birth of the cria and latest MVA vaccination of the foaling mare (mo, months); ° time point initial sampling = time point (TP) 5 (Table 1).

### 3.4. Results of Swab Samples

None of the oral swab samples tested positive for OPV-specific DNA in herd I or II at any time points in the study.

## 4. Discussion

Two separate clusters of CPXV infection in two alpaca herds in Germany [14,16] prompted MVA vaccination to prevent further cases of cowpox disease and fatalities. To the authors' knowledge, this had not yet been described, and therefore provided a unique opportunity to study the safety and effectiveness of the MVA vaccine in alpacas in the field.

Our results showed that the MVA vaccine was safe and well tolerated in both alpaca herds. Mild self-limiting vaccine reactions occurred after the initial vaccination in only three of 94 animals. No other side effects were observed at any time point.

The virulence of MVA is considerably reduced compared with the field strain of CPXV and therefore a minimal effective virus concentration of  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL vaccine, administered twice parenterally, three to four weeks apart, is recommended to achieve protective immunity against cowpox [25]. This same prime-boost vaccination regimen using a dose of 2.0 mL for adults and 1.0 mL for crias was implemented in the present study and led to detectable antibody titres in most of the animals after the first or second vaccination. A noticeable increase in antibody titres after the second vaccination in both herds confirmed the effect of the booster vaccination. Our results are in agreement with those of other studies on cynomolgus monkeys [38], rhesus monkeys [39], domestic cats [33], elephants [25,31] and rabbits [34].

The results of a one-year follow-up evaluation showed changes in individual antibody titres, which were group dependent but similar in both herds. A decrease in antibody titre over the one-year period was common in most of the animals, especially in groups 1 and 2. However, there were marked differences in the speed and degree of the titre decrease. Group 1 animals had stable positive antibody titres, which were only decreased at the last time point. This group consisted of CPXV-naïve and CPXV-exposed animals, which had analogous titre changes, indicating that CPXV-naïve animals had a very good immune response to the MVA vaccine, or, more likely, had had a CPXV infection that was not detected. The CPXV-specific antibody titres of animals that had been exposed to natural

CPXV infection increased after MVA vaccine, which had a boosting effect. A similar boosting effect post-infection was described in jaguars, snow leopards, jaguarundis [9] and domestic cats [33].

The animals in group 2 had a decrease in titre or negative titre six months after the second vaccination or at the final end point. There are no long-term studies on the duration of protective immunity after MVA vaccination in animals. Human studies on the safety and immunogenicity of the MVA vaccine [23,29,40] showed that titres decreased by six months and two years after initial immunisation using two doses of vaccine administered four weeks apart. In addition, antibody titres of vaccinia-naïve and vaccinia-experienced subjects differed with significantly higher titres two years after booster vaccination in the latter [23,29]. Similar conclusions can be drawn from our data because MVA vaccination of CPXV-naïve animals of group 2 did not result in antibody titres as high or as long-lasting as those in the CPXV-exposed animals of group 1. Nevertheless, the majority (58%) of vaccinated alpacas had a decrease in or negative antibody titre one year after prime-boost vaccination, and we assumed that this was attributable to an alpaca-specific reaction to the MVA vaccination in CPXV-naïve animals.

Group 3 had four animals that had no antibody production as determined by the IFA. It is possible that these animals had no immunological response to MVA vaccination or that their antibody titres were below the detection limits of our test systems. More sensitive assays and test systems that determine cellular immunity in alpacas are needed to address this issue in future studies.

The fluctuations in antibody titres seen in group 4 were of interest. The increase in titres more than six months after the booster vaccination may have been attributable to the new exposure to CPXV in the field, especially in animal No. 10, which had reproducible results in both tests. CPXV infections in animals often occur in seasonal peaks (winter; late summer/autumn) during the year [16]. Time points 4 (February/May) and 5 (July/November) corresponded to these seasonal peaks, and thus exposure to CPXV in the environment cannot be ruled out.

All oral swab samples collected for the detection of acute CPXV infection tested negative for OPV-specific DNA. Based on the results of studies in other alpaca herds [16], a negative oral swab sample alone does not rule out CPXV infection. Therefore, thorough clinical examination including careful palpation of the skin and fleece, especially the cranial areas, and complete and fastidious sampling of crusts and suspicious lesions of the skin and mucous membranes, is required to confirm acute CPXV infection. Nevertheless, based on our results, we assumed that no acute clinical CPXV infection was present at the times of sampling.

Another aim of this study was to determine whether crias born to vaccinated mares have specific serum maternal antibodies to MVA in the first weeks of life. Our results confirmed that MVA-specific maAbs were detectable in new-born crias up to an age of 14 weeks. We also showed that this status was closely associated with a positive antibody titre in the mare. Maternal immunoglobulins are transferred to crias via the colostrum because the epitheliochorial placenta does not allow passage of immunoglobulins from dam to fetus [41]. This means that a positive maternal titre as well as adequate colostrum intake in the first hours of life are essential for the immunoprotection of crias in the first weeks of life. Based on our results, it is very likely that MVA vaccination of mares provides protection of new-born crias against clinical CPXV infection. Therefore, it is best to vaccinate mares in late pregnancy, at least four weeks before parturition, to ensure high antibody titres.

In our study, we vaccinated crias with MVA vaccine immediately after initial sampling in the first weeks of life, even though maternal immunoglobulins were present. Because all crias were seronegative six and 12 months after vaccination, we concluded that vaccination of crias with maAb titres is not appropriate. The half-life of maternal immunoglobulins in alpacas and llamas is believed to be 10 to 23 days, with the disappearance of 97% of colostral maternal immunoglobulins by 115 days [41]. It is also well known that maternal antibodies hinder the antigenic response to vaccination [42]. Thus, initial vaccination of crias should be done after the loss of passive immunity afforded by maAbs, which is reported to occur by three-and-a-half months of age at the earliest [41].

In summary, the MVA vaccination of alpacas is feasible and well tolerated. It is not known whether the titres measured are protective against natural CPXV infection, because the value of the animals and animal welfare regulations precluded experimental challenge with CPXV. It appears that MVA is as immunogenic as the field virus [43], and we feel that this vaccine would provide adequate immunoprotection because no new cases of fatal CPXV infection were observed in the two herds after immunisation. Although most of the alpacas had a negative titre one year after prime-boost vaccination, it is likely that once an animal has responded to CPXV or MVA, immunological memory would enable protection in the face of CPXV infection. This may have been the situation in animal ID 10, which had a detectable antibody titre six months after the titre had declined to an undetectable level.

## 5. Conclusions

Alpaca herds are constantly at risk of CPXV infection because of their husbandry systems, which allow contact between the animals and reservoir hosts [16]. Alpaca herds have a close relationship with the human population, making MVA vaccination of SACs an important prophylactic tool because of the zoonotic potential of the disease. The duration of vaccinal immunity and the necessity for booster vaccinations after the initial immunisation need to be investigated in long-term studies.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1999-4915/12/2/234/s1>: Table S1: Individual antibody titres over time after using a prime and boost MVA vaccination regimen against cowpox in two alpaca herds in Germany.

**Author Contributions:** A.P., D.G., M.K., A.S., M.B., M.P. and T.W.V. conceived and designed the procedure for MVA vaccination and investigations in the alpaca herds. D.G., A.P. and M.K. carried out all investigations in the two alpaca herds. D.H. and M.B. completed virological and molecular examinations. A.P., D.H., M.P. and A.S. recorded, validated and interpreted the data and wrote the manuscript. K.W. carried out statistical analysis and created tables and figures. A.P. and D.H. contributed equally to this study. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The study was partially funded by the German Research Foundation SPP1596 project BE5187 awarded to M.B. A.P. was funded by a scholarship (funding No. WEV-R-A09-02-1116) from the University of Leipzig and the Saxon State Ministry for Science and the Arts.

**Acknowledgments:** We thank the owners of the two alpaca herds for their generosity and support of our herd investigations. In addition, we want to thank Anne Kaiser, Helena Fieseler, Romy Weck, Sarah Grund and Matthias Hoops (employees/graduate students or former employees of the Clinic for Ruminants and Swine) for their support during the study. We acknowledge Annkathrin Ruhland, Doris Junghans and Mareen Lange for their excellent technical assistance. We thank the Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig Maximilians University München, Munich, Germany, for kindly providing the MVA vaccine. We acknowledge support from the German Research Foundation (DFG) and University of Leipzig within the program of Open Access Publishing.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Essbauer, S.; Pfeffer, M.; Meyer, H. Zoonotic poxviruses. *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 229–236. [CrossRef]
2. Eulenberger, K.; Bernhard, A.; Nieper, H.; Hoffmann, K.; Scheller, R.; Meyer, H.; Zimmermann, P.; Kiessling, J. An outbreak of cowpox virus infection in a black rhino (*dicerus bicornis*) at Leipzig Zoo. *Verh ber Erkrgr Zootiere* **2005**, *42*, 77–85.
3. Knieriem, A. Pockenerkrankung eines Asiatischen Elefantenbullens—Fallbericht einer generalisierten Infektion. *Tagungsbericht Arbeitstagung der Zootierärzte im Deutschsprachigen Raum* **2002**, *21*, 9–14.
4. Pilaski, J.; Jacoby, F. Die Kuhpocken-Erkrankungen der Zootiere. *Verh ber Erkrgr Zootiere* **1993**, *35*, 39–50.
5. Pilaski, J.; Von Witzendorff, P.; Brandt, H.-P.; Höhr, D. Ein Pockenausbruch bei Elefanten (*Elephas maximus*, *Loxodonta africans*) in einem Wanderzirkus während des Aufenthaltes im Winterquartier. *Verh ber Erkrgr Zootiere* **1995**, *37*, 357–363.
6. Schaller, K.; Pilaski, J. Pocken bei Breitmaulnashörnern (*Ceratotherium s. simum*) im Zoologischen Garten Münster. *Zool. Garten N. F.* **1979**, *49*, 169–184.
7. Kalthoff, D.; Bock, W.-I.; Hühn, F.; Beer, M.; Hoffmann, B. Fatal cowpox virus infection in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*) in Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis. (Larchmt. N. Y.)* **2014**, *14*, 303–305. [CrossRef] [PubMed]

8. Kik, M.J.L.; Liu, P.L.; Van Asten, J.A.M. Cowpoxvirus infection in the Patagonian cavy (*Dolichotis patagonum*) emerging disease in an educational animal park the first reported case. *Vet. Q.* **2006**, *28*, 42–44. [[CrossRef](#)]
9. Kurth, A.; Straube, M.; Kuczka, A.; Dunsche, A.J.; Meyer, H.; Nitsche, A.; Art, F.Y.P. Cowpox Virus Outbreak in Banded Mongooses (*Mungos mungo*) and Jaguarundis (*Herpailurus yagouaroundi*) with a Time-Delayed Infection to Humans. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Marennikova, S.S.; Maltseva, N.N.; Korneeva, V.I.; Garanina, N.M. Outbreak of Pox Disease among Carnivora (Felidae) and Edentata. *J. Infect. Dis.* **1977**, *135*, 358–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Mätz-Rensing, K.; Ellerbrok, H.; Ehlers, B.; Pauli, G.; Floto, A.; Alex, M.; Czerny, C.-P.; Kaup, F.-J. Fatal poxvirus outbreak in a colony of New World monkeys. *Vet. Pathol.* **2006**, *43*, 212–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Schüppel, K.-F.; Menger, S.; Eulenberger, K.; Bernhard, A.; Pilaski, J. Kuhpockeninfektion bei Alpakas (*Lama Glama pacos*). *Verh ber Erkrz Zootiere* **1997**, *38*, 259–265.
13. Cardeti, G.; Brozzi, A.; Eleni, C.; Polici, N.; D’Alterio, G.; Carletti, F.; Scicluna, M.T.; Castiletti, C.; Capobianchi, M.R.; Di Caro, A.; et al. Cowpox Virus in Llama, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 1513–1515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Goerigk, D.; Theuß, T.; Pfeffer, M.; Konrath, A.; Kalthoff, D.; Woll, D.; Vahlenkamp, T.W.; Beer, M.; Starke, A. Kuhpockenvirusinfektion bei einem Alpaka (*Vicugna pacos*)-klinische Symptomatik, Diagnostik und pathologische Befunde. *Tierärztl Prax* **2014**, *42*, 169–177.
15. Franke, A.; Pfaff, F.; Jenckel, M.; Hoffmann, B.; Höper, D.; Antwerpen, M.; Meyer, H.; Beer, M.; Hoffmann, D. Classification of Cowpox Viruses into Several Distinct Clades and Identification of a Novel Lineage. *Viruses* **2017**, *9*, 142. [[CrossRef](#)]
16. Prkno, A.; Hoffmann, D.; Goerigk, D.; Kaiser, M.; Van Maanen, A.C.F.; Jeske, K.; Jenckel, M.; Pfaff, F.; Vahlenkamp, T.W.; Beer, M.; et al. Epidemiological Investigations of Four Cowpox Virus Outbreaks in Alpaca Herds, Germany. *Viruses* **2017**, *9*, 344. [[CrossRef](#)]
17. Prkno, A.; Kaiser, M.; Goerigk, D.; Pfeffer, M.; Vahlenkamp, T.W.; Hoffmann, D.; Beer, M.; Starke, A. Klinisches Erscheinungsbild der Kuhpockenvirus-infektion bei Neuweltkameliden. *Tierärztl Prax* **2018**, *46*, 50–56. [[CrossRef](#)]
18. Foster, S.A.; Parker, S.; Lanier, R. The Role of Brincidofovir in Preparation for a Potential Smallpox Outbreak. *Viruses* **2017**, *9*, 320. [[CrossRef](#)]
19. Mucker, E.M.; Goff, A.J.; Shamblin, J.D.; Grosenbach, D.W.; Damon, I.K.; Mehal, J.M.; Holman, R.C.; Carroll, D.; Gallardo, N.; Olson, V.A.; et al. Efficacy of tecovirimat (ST-246) in nonhuman primates infected with variola virus (Smallpox). *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 6246–6253. [[CrossRef](#)]
20. Quenelle, D.C.; Kern, E.R. Treatment of Vaccinia and Cowpox Virus Infections in Mice with CMX001 and ST-246. *Viruses* **2010**, *2*, 2681–2695. [[CrossRef](#)]
21. Smee, D.F. Orthopoxvirus inhibitors that are active in animal models: An update from 2008 to 2012. *Future Virol.* **2013**, *8*, 891–901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yang, G.; Pevear, D.C.; Davies, M.H.; Collett, M.S.; Bailey, T.; Rippen, S.; Barone, L.; Burns, C.; Rhodes, G.; Tohan, S.; et al. An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus Challenge. *J. Virol.* **2005**, *79*, 13139–13149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Meyer, H. Summary Report on First, Second and Third Generation Smallpox Vaccines. 2013. Available online: [http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2013/november/2\\_Smallpox\\_vaccine\\_review\\_updated\\_11\\_10\\_13.pdf](http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2013/november/2_Smallpox_vaccine_review_updated_11_10_13.pdf) (accessed on 28 April 2018).
24. Mayr, A.; Hochstein-Mintzel, V.; Stickl, H. Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. *Infection* **1975**, *3*, 6–14. [[CrossRef](#)]
25. Mahnel, H.; Mayr, A. Erfahrungen bei der Schutzimpfung gegen Orthopocken von Mensch und Tier mit dem Impfstamm MVA. *Berl. Münchener Tierärztliche Wochenschr.* **1994**, *107*, 253–256.
26. Meyer, H.; Sutter, G.; Mayr, A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* **1991**, *72*(Pt. 5), 1031–1038. [[CrossRef](#)]
27. Mayr, A.; Stickl, H.; Müller, H.K.; Danner, K.; Singer, H. Der Pockenimpfstamm MVA: Marker, genetische Struktur, Erfahrungen mit der parenteralen Schutzimpfung und Verhalten im abwehrgeschwächten Organismus. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe B Hyg. Betr. Prav. Med.* **1978**, *167*, 375–390.



28. Greenberg, R.N.; Hurley, M.Y.; Hurley, Y.; Dinh, D.V.; Mraz, S.; Vera, J.G.; Von Bredow, D.; Von Krempelhuber, A.; Roesch, S.; Virgin, G.; et al. A Multicenter, Open-Label, Controlled Phase II Study to Evaluate Safety and Immunogenicity of MVA Smallpox Vaccine (IMVAMUNE) in 18-40 Year Old Subjects with Diagnosed Atopic Dermatitis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138348.
29. European Medicines Agency. European Public Assessment Report—IMVANEX, Common Name—Modified Vaccinia Ankara Virus, Anhang I—Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Available online: [http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002596/WC500147896.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002596/WC500147896.pdf) (accessed on 5 June 2018).
30. Vaughan, A.; Aarons, E.; Astbury, J.; Balasegaram, S.; Beadsworth, M.; Beck, C.R.; Chand, M.; O'Connor, C.; Dunning, J.; Ghebrehewet, S.; et al. Two cases of monkeypox imported to the United Kingdom, September 2018. *Eurosurveillance* **2018**, *23*, 1800509. [[CrossRef](#)]
31. Pilaski, J.; Zhou, X. Die Pockenimpfung der Elefanten. *Verh ber Erkrz Zootiere* **1991**, *33*, 203–211.
32. Cardeti, G.; Gruber, C.E.M.; Eleni, C.; Carletti, F.; Castilletti, C.; Manna, G.; Rosone, F.; Giombini, E.; Selleri, M.; Lapa, D.; et al. Fatal Outbreak in Tonkean Macaques Caused by Possibly Novel Orthopoxvirus, Italy, January 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1941–1949. [[CrossRef](#)]
33. Lauer, J. Untersuchungen über die Wirksamkeit und Unschädlichkeit einer Schutzimpfung von Katzen gegen Pocken mit MVA-Lebendimpfstoff. Ph.D. Thesis, Ludwig Maximilian University of Munich, Munich, Bavaria, Germany, 1993.
34. Munz, E.; Linckh, S.; Renner-Müller, I.C.; Reimann, M. Die Wirksamkeit einer Immunisierung mit Vaccinia-Virusstamm “MVA” gegen eine Infektion mit Kuhpocken-Virusstamm “OPV 85” beim Kaninchen. *Zent. Vet. B* **1993**, *40*, 131–140. [[CrossRef](#)]
35. Härdi-Landerer, M.C.; Leu, M.; Steiner, A. Der polyvalente Moderhinke-Impfstoff im Praxistest. *Tierärztl Prax* **2012**, *40*, 294–300.
36. Hoffmann, D.; Franke, A.; Jenckel, M.; Tamošiūnaitė, A.; Schluckebier, J.; Granzow, H.; Hoffmann, B.; Fischer, S.; Ulrich, R.G.; Höper, D.; et al. Out of the Reservoir: Phenotypic and Genotypic Characterization of a Novel Cowpox Virus Isolated from a Common Vole. *J. Virol.* **2015**, *89*, 10959–10969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Maksyutov, R.A.; Gavrilova, E.V.; Meyer, H.; Shchelkunov, S.N. Real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J. Virol. Methods* **2015**, *211*, 8–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Earl, P.L.; Americo, J.L.; Wyatt, L.S.; Eller, L.A.; Whitbeck, J.C.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J.; Hartmann, C.J.; Jackson, D.L.; Kulesh, D.A.; et al. Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature* **2004**, *428*, 182–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Grandpre, L.E.; Duke-Cohan, J.S.; Ewald, B.A.; Devoy, C.; Barouch, D.H.; Letvin, N.L.; Reinherz, E.L.; Baden, L.R.; Dolin, R.; Seaman, M.S. Immunogenicity of recombinant Modified Vaccinia Ankara following a single or multi-dose vaccine regimen in rhesus monkeys. *Vaccine* **2009**, *27*, 1549–1556. [[CrossRef](#)]
40. Greenberg, R.N.; Hay, C.M.; Stapleton, J.T.; Marbury, T.C.; Wagner, E.; Kreitmair, E.; Roesch, S.; Von Krempelhuber, A.; Young, P.; Nichols, R.; et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase II Trial Investigating the Safety and Immunogenicity of Modified Vaccinia Ankara Smallpox Vaccine (MVA-BN<sup>®</sup>) in 56-80-Year-Old Subjects. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157335. [[CrossRef](#)]
41. Zanolari, P. Neuweltkameliden—Von der Geburtsvorbereitung bis zur Versorgung der Neugeborenen. *Forum* **2006**, *12*, 6–12.
42. Van Maanen, C.; Bruin, G.; De Boer-Luijtz, E.; Smolders, G.; De Boer, G.F. Interference of maternal antibodies with the immune response of foals after vaccination against equine influenza. *Vet. Q.* **1992**, *14*, 13–17. [[CrossRef](#)]
43. Price, P.J.R.; Torres-Domínguez, L.E.; Brandmüller, C.; Sutter, G.; Lehmann, M.H. Modified Vaccinia virus Ankara: Innate immune activation and induction of cellular signalling. *Vaccine* **2013**, *31*, 4231–4234. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Table S1:** Individual antibody titres over time after using a prime and boost MVA vaccination regimen against cowpox in two alpaca herds in Germany

ID	Herd	Gr	P	Age in years	Sex	Pre-existing field titre		IFA (MVA)			
						IFA (CPXV)*	IFA (MVA)**	TP2	TP3	TP4	TP5
101	I	1	1	4.25	f	1:500	1:500	1:2,000	1:500	1:200	1:200
103	I	1	1	7.45	f	1:500	1:2,000	1:4,000	1:4,000	1:1,000	1:1,000
118	I	1	1	0.15	m		n.d.	1:200	1:4,000	1:200	1:200
136	I	1	1	5.33	f		1:4000	1:4,000	1:8,000	1:2,000	1:2,000
138	I	1	1	6.57	f	1:500	1:4000	1:1,000	1:2,000	1:500	1:500
139	I	1	1	10.49	f	1:500	>0<1:200	1:500	1:500	1:200	1:200
145	I	1	1	8.50	f	1:200	1:500	1:4,000	1:2,000	1:500	1:1,000
166	I	1	1	1.53	m	1:500	1:2,000	1:4,000	1:8,000	1:2,000	1:1,000
1	II	1	1	2.99	f		<1:200	1:1,000	1:500	1:500	1:500
2	II	1	1	5.01	f		<1:200	1:1,000	1:1,000	1:1,000	1:200
3	II	1	1	3.79	f		<1:200	1:1,000	1:500	1:500	1:200
12	II	1	1	1.84	f	1:500	1:4,000	1:1,000	1:1,000	1:500	1:500
15	II	1	1	3.98	f		<1:200	1:8,000	1:4,000	1:2,000	1:1,000
16	II	1	1	1.86	f	1:500	1:8,000	1:4,000	1:2,000	1:2,000	1:1,000
17	II	1	1	6.31	f		<1:200	1:4,000	1:2,000	1:1,000	1:500
20	II	1	1	4.00	f		<1:200	1:2,000	1:1,000	1:200	1:500
25	II	1	1	2.75	f		<1:200	1:1,000	1:500	1:200	1:200
112	I	2	2	0.11	m		n.d.	1:500	1:500	1:500	>0<1:200
9	II	2	2	2.08	m		<1:200	1:200	1:4,000	1:200	>0<1:200
8	II	2	3	2.00	m		<1:200	<1:200	1:4,000	1:500	1:500
165	I	2	4	1.75	m	1:500	<1:200	1:1000	1:1,000	<1:200	<1:200
105	I	2	4	4.34	f		<1:200	1:200	1:500	<1:200	<1:200
109	I	2	4	0.19	f		n.d.	1:200	1:2,000	<1:200	<1:200
123	I	2	4	4.25	f		<1:200	1:200	1:200	<1:200	<1:200
125	I	2	4	1.74	f		<1:200	1:200	1:1,000	<1:200	<1:200
131	I	2	4	0.31	f		n.d.	1:200	1:2,000	<1:200	<1:200
133	I	2	4	1.24	f		<1:200	1:200	1:500	<1:200	<1:200
135	I	2	4	5.62	f		<1:200	1:500	1:200	<1:200	<1:200
150	I	2	4	1.28	f		<1:200	1:200	1:500	<1:200	<1:200
154	I	2	4	4.23	m		<1:200	1:200	1:500	<1:200	<1:200
158	I	2	4	7.26	m		<1:200	1:200	1:500	<1:200	<1:200
159	I	2	4	2.29	m		<1:200	1:200	1:500	<1:200	<1:200
162	I	2	4	1.56	m		<1:200	1:200	1:200	<1:200	<1:200
120	I	2	5	0.31	f		n.d.	<1:200	1:500	1:200	<1:200
13	II	2	6	0.91	m		<1:200	>0<1:200	1:1,000	>0<1:200	<1:200
21	II	2	6	6.01	f		<1:200	>0<1:200	1:1,000	>0<1:200	<1:200
116	I	2	7	0.13	m		n.d.	<1:200	1:500	>0<1:200	<1:200
27	II	2	7	4.84	f		<1:200	<1:200	1:1,000	>0<1:200	<1:200
128	I	2	8	1.69	f		<1:200	>0<1:200	1:500	<1:200	<1:200
134	I	2	8	2.52	f		<1:200	>0<1:200	1:1000	<1:200	<1:200
147	I	2	8	0.32	m		n.d.	>0<1:200	1:200	<1:200	<1:200
161	I	2	8	1.68	m		<1:200	>0<1:200	1:500	<1:200	<1:200
18	II	2	8	0.88	f		<1:200	>0<1:200	1:200	<1:200	<1:200
102	I	2	9	0.12	m		n.d.	<1:200	1:200	<1:200	<1:200
106	I	2	9	4.42	f		<1:200	<1:200	1:200	<1:200	<1:200
107	I	2	9	0.07	f		n.d.	<1:200	1:500	<1:200	<1:200
111	I	2	9	4.00	f		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	<1:200

113	I	2	9	4.25	f		<1:200	<1:200	1:200	<1:200	<1:200
114	I	2	9	0.08	m		n.d.	<1:200	1:1,000	<1:200	<1:200
117	I	2	9	4.25	f		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	<1:200
122	I	2	9	1.75	f		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	<1:200
124	I	2	9	2.13	f		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	<1:200
129	I	2	9	1.85	f		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	<1:200
130	I	2	9	4.25	f		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	<1:200
132	I	2	9	2.37	f		<1:200	<1:200	1:200	<1:200	<1:200
142	I	2	9	4.42	f		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	<1:200
146	I	2	9	4.25	f		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	<1:200
148	I	2	9	2.50	f		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	<1:200
156	I	2	9	3.36	m		<1:200	<1:200	1:200	<1:200	<1:200
157	I	2	9	2.32	m		<1:200	<1:200	1:200	<1:200	<1:200
160	I	2	9	1.27	m		<1:200	<1:200	1:200	<1:200	<1:200
164	I	2	9	1.64	m		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	<1:200
167	I	2	9	1.76	m		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	<1:200
7	II	2	9	9.76	m		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	<1:200
14	II	2	9	4.77	f		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	<1:200
19	II	2	9	0.94	f		<1:200	<1:200	1:200	<1:200	<1:200
22	II	2	9	15.45	f		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	<1:200
108	I	2	10	4.25	f		<1:200	1:200	<1:200	<1:200	<1:200
149	I	3	11	4.34	f		<1:200	>0<1:200	>0<1:200	<1:200	<1:200
104	I	3	12	0.07	f		n.d.	<1:200	>0<1:200	<1:200	<1:200
115	I	3	12	5.08	f		<1:200	<1:200	>0<1:200	<1:200	<1:200
121	I	3	12	3.35	f		<1:200	<1:200	>0<1:200	<1:200	<1:200
140	I	3	12	4.34	f		<1:200	<1:200	>0<1:200	<1:200	<1:200
153	I	3	12	7.37	m		<1:200	<1:200	>0<1:200	<1:200	<1:200
24	II	3	12	11.45	f		<1:200	<1:200	>0<1:200	<1:200	<1:200
126	I	3	13	3.22	f		<1:200	<1:200	<1:200	<1:200	<1:200
127	I	3	13	0.38	m		n.d.	<1:200	<1:200	<1:200	<1:200
143	I	3	13	0.34	f		n.d.	<1:200	<1:200	<1:200	<1:200
151	I	3	13	2.50	f		<1:200	<1:200	<1:200	<1:200	<1:200
163	I	3	13	1.64	m		<1:200	<1:200	<1:200	<1:200	<1:200
23	II	3	13	6.75	f		<1:200	<1:200	<1:200	<1:200	<1:200
155	I	4	14	4.97	m		<1:200	1:500	1:200	<1:200	1:200
152	I	4	15	1.26	f		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	1:200
10	II	4	15	2.02	m		<1:200	<1:200	1:2,000	<1:200	1:200
137	I	4	16	1.09	f		n.d.	<1:200	1:200	<1:200	>0<1:200
11	II	4	16	10.03	m		<1:200	<1:200	1:500	<1:200	>0<1:200
6	II	4	17	8.55	m		<1:200	1:200	1:1,000	<1:200	>0<1:200
144	I	4	18	1.12	f		n.d.	>0<1:200	1:200	<1:200	>0<1:200

ID, animal identity number; Herd: I – Thuringia (n = 64); II – Saxony Anhalt (n = 24); Gr, group; P, individual titre changes; IFA, indirect immunofluorescence assay (endpoint dilution); <1:200, dilution 1:200 tested negative; >0<1:200, dilution 1:200 tested intermediate; CPXV, cowpox virus; MVA, modified vaccinia virus Ankara; TP, time point (2 – four weeks after initial vaccination, 3 – four weeks after booster vaccination, 4 – six months after booster vaccination, 5 – 12 months after boost vaccination); n.d., not done (animal had not been born or was too young for sampling at the time of previous investigations performed by [16]); \* results according to [16]; \*\* serum samples collected in a previous study [16], re-tested using IFA (MVA)



## 6 Diskussion

Die Kuhpockenvirusinfektion ist in Deutschland eine sporadisch auftretende Erkrankung, deren Auftreten im Zeitraum 2012 – 2017 hauptsächlich für Hauskatzen und nur ein kleiner Anteil für ‚andere Tierarten‘ gemeldet wurde (FLI 2014a; FLI 2014b; FLI 2016a; FLI 2016b; FLI 2017; FLI 2018). Just in diesem Zeitraum ereigneten sich vier unabhängige Ausbrüche dieser Infektion im Einzugsgebiet der Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät in Leipzig bei der Tierart Alpaka, was es möglich machte, die Kuhpockenvirusinfektion bei dieser Tierart intensiver zu untersuchen.

In der Literatur finden sich zahlreiche Fallberichte bei vielen verschiedenen Tierarten, die in der Gesamtheit ein umfassendes, tierartenübergreifendes Bild der klinischen Erscheinung dieser Erkrankung darstellen (Publikation 1). CPXV-Infektionen bei Neuweltkameliden waren bis dato nur sehr selten beschrieben (SCHÜPPEL et al. 1997, CARDETI et al. 2011, GOERIGK et al. 2014), trotzdem gleichen die Beschreibungen des klinischen Bildes jenen bei anderen Tierarten (Publikation 1). Auch bei Neuweltkameliden tritt die Erkrankung in zwei klinischen Verlaufsformen auf (Hypothese 1 konnte somit bestätigt werden): mild, lokalisiert, selbstlimitierend vs. generalisiert, dramatisch bis letal. Es konnte ebenso für Alpakas und Lamas festgestellt werden, dass eine Schwächung des Immunsystems z.B. durch eine Vor- oder Begleiterkrankung Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat. Die Ergebnisse der Herdenuntersuchungen in den vier Alpakabeständen bestätigen diese Erkenntnisse (Publikation 2). In allen vier Beständen gab es mindestens ein Tier, das an einer generalisierten CPXV-Infektion erkrankte und verstarb. Bei der Mehrzahl dieser Tiere wurden Vor- oder Begleiterkrankungen festgestellt (GOERIGK et al. 2014, PRKNO et al. unveröffentlichte Daten). In drei der vier Bestände wurden weiterhin Tiere identifiziert, die an einem milden Krankheitsverlauf erkrankten. Dieser trat in allen drei Beständen häufiger auf als der generalisierte Verlauf und zeigte sich in einzelnen oder mehreren lokal begrenzten umschriebenen Effloreszenzen der Haut oder auch als serös bis eitrig einseitige Keratokonjunktivitis. Bei einzelnen seropositiven Tieren, bei denen zum Untersuchungszeitpunkt keine klinischen Symptome gefunden wurden, ist davon auszugehen, dass es zumindest eine Primäreffloreszenz gegeben hat, die entweder schon abgeheilt war oder auf Grund ihrer Größe (zum Teil nur ca. 4 – 5 mm im Durchmesser) und wegen des dichten Vlieses der Tiere möglicherweise übersehen wurde.

Bezüglich der Epidemiologie der CPXV-Infektion speziell bei Alpakas fehlte es bisher an gezielten Studien oder Infektionsversuchen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermöglichen nun hinsichtlich des Erregerreservoirs, Eintrag des Virus in die Herde, Virusnachweis im Einzeltier und Erregerverbreitung in der Herde ein besseres Verständnis. So konnte im Rahmen dieser Studie auch für Alpakas bestätigt werden, dass das Virus durch eine externe Infektionsquelle in die Bestände

getragen wird. Wühlmäuse, im Besonderen die Feldmaus und die Rötelmaus, und z.T. auch Langschwanzmäuse (hier die Brandmaus) wurden im Umfeld der Bestände als CPXV-infiziert identifiziert und können als Erregerreservoir benannt werden. Die fast 100%ige phylogenetische Übereinstimmung des CPXV-Isolates aus der Feldmaus und des CPXV-Isolates vom Alpaka aus demselben Bestand beweisen eindeutig, dass hier eine Übertragung stattgefunden hat (Publikation 2). Hypothese 2 wurde somit durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt. Die artgerechte Haltung dieser Tiere in Weide- oder Offenstallhaltung macht es unmöglich einen Alpaka-Maus-Kontakt (direkt oder indirekt) zu verhindern. Demnach muss davon ausgegangen werden, dass in endemischen Gebieten die Möglichkeit des Viruseintrages in eine Alpakaherde über das Erregerreservoir Wühlmaus jeder Zeit möglich ist und ein nicht unerhebliches Risiko einer CPXV-Infektion mit sich bringt. Den Ergebnissen dieser Arbeit nach zu urteilen, scheint das Risiko bei Alpakaherden saisonabhängig im Winter am höchsten zu sein. Es liegt die Vermutung nahe, dass der Winter die Jahreszeit ist, in der das Nahrungsangebot für Wühlmäuse am geringsten ist und sie deswegen die Nähe zum Menschen und zu Tieren suchen. Ein Offenstall einer Alpakaherde bietet ihnen optimale Bedingungen für Witterungsschutz und Futterangebot.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen weiterhin, dass der direkte Erregernachweis mittels PCR, wie bei HOFFMANN et al. (2015) und MAKSYUTOV et al. (2015) beschrieben, auch bei Alpakas die schnellste und sicherste Methode zum Nachweis einer akuten CPXV-Infektion darstellt. Ergänzend dazu ist der Nachweis von OPV-spezifischen Antikörpern mittels Serum-Paarproben im Abstand von ca. 21 – 28 Tagen eine adäquate, synergistische Methode zum Nachweis dieser Infektion auf Herdenbasis. Aus den Erkenntnissen der Untersuchungen im Rahmen dieses Dissertationsprojektes muss betont werden, dass diese diagnostischen Methoden nur so zuverlässig sein können, wie das dazu gewonnene Probenmaterial. Eine besonders sorgfältige klinische Untersuchung jedes Tieres (egal ob Einzeltier- oder Herdenuntersuchung) bildet dafür die Basis. Als sehr zuverlässiges Probenmaterial haben sich in den vorliegenden Untersuchungen Abstriche von Läsionen der Haut bzw. der Schleimhäute und Krusten von Pockenläsionen gezeigt. Es liegt an der Genauigkeit des Untersuchers, solche Läsionen unter meist voll bevliesten Alpakas zu finden und als probenrelevant einzuschätzen. Ebenso lassen die Untersuchungen der eigenen Arbeit die Erkenntnis zu, dass ein umfassendes Bild des Ausbreitungsgrades der Infektion im Bestand bzw. ein zuverlässiger Überblick über das Infektionsgeschehen im Bestand nur zu erhalten ist, wenn von allen Tieren des Bestandes zeitgleich Serum-Paarproben und Proben für die PCR entnommen werden, auch wenn dies je nach Bestandsgröße unter Umständen einen nicht unerheblichen logistischen Aufwand bedeutet.

Während bei anderen Tierarten (Elefanten, Katze, Affen, Ratten) zumeist von einer Erregerverbreitung durch direkten Tierkontakt ausgegangen wird (BENNETT et al. 1986, PILASKI und JACOBY 1993,

KRAMSKI et al. 2010), hat sich in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Erregerverbreitung durch direkten Tierkontakt bei Alpakas von untergeordneter Relevanz zu sein scheint. Alpakas als Distanztier, meiden den direkten Tierkontakt zu Artgenossen. Die Möglichkeit dafür besteht am ehesten bei Rangkämpfen (Bespuken als Abwehrverhalten), beim Säugen von Crias beim Muttertier oder beim Deckakt (GAULY et al. 2011, BINDER 2014). Weitaus größere Bedeutung hat beim Alpaka die indirekte Erregerübertragung. In der vorliegenden Arbeit wurde CPXV in verschiedensten Pockenläsionen (Haut, Maul- und Nasenschleimhaut, Konjunktiven), im Kot und an einer Bürste zur Fellpflege nachgewiesen. Bedenkt man dazu tierartspezifische Verhaltensweisen und Haltungsbedingungen, wie gleichzeitiges Fressen aus Heu- und Kraftfutterraufen, das gemeinsame Nutzen von Gegenständen zur Körperpflege und eines Kotplatzes („Geilstellen“; GAULY et al. 2011) in Kombination mit der langen Überlebensfähigkeit von CPXV in Krusten in der Umgebung (ESSBAUER et al. 2007), bieten sich viele potenzielle Übertragungsmöglichkeiten. Ergänzend ist der indirekte Übertragungsweg zwischen Herden eines Bestandes durch tierbezogene Utensilien, kontaminiertes Raufutter oder Wassereimer und Menschenkontakt nicht außer Acht zu lassen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie würden demnach die aufgestellte Hypothese, dass das Virus innerhalb der Herde durch direkten Tierkontakt von Tier zu Tier übertragen wird, nicht komplett widerlegen, dennoch betonen, dass die Übertragung mit großer Sicherheit eher auf indirektem Weg von statten geht und dieser Sachverhalt bei dieser Tierart besonders berücksichtigt werden sollte.

Eine kausale Therapiemöglichkeit der CPXV-Infektion steht derzeit nicht zur Verfügung. Erfolgsversprechende Wirkstoffe gegen OPV sind bekannt, aber für Tiere in Deutschland oder Europa noch nicht zur Therapie zugelassen (NITSCHKE 2010, SMEE 2013, EMA 2019). Es stellt sich auch die Frage, ob besonders generalisiert erkrankte Tiere so zeitnah einer tierärztlichen Behandlung zugeführt werden, dass ein potenzieller Wirkstoff rechtzeitig ins Krankheitsgeschehen eingreifen kann, bevor das Virus ein Multiorganversagen ausgelöst hat. Als wesentlich sinnvollere Maßnahme erscheint hier die prophylaktische Impfung, um einem Krankheitsausbruch generell vorzubeugen. Gute Erfolge bezüglich der Prophylaxe von OPV-Infektionen wurden mit dem MVA-Impfstoff beschrieben (LAUER 1993, MUNZ et al. 1993, MAHNEL und MAYR 1994, KURTH et al. 2009, CARDETI et al. 2017). Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte bestätigt werden, dass der MVA-Impfstoff bei Alpakas sehr gut verträglich ist. Die dazu aufgestellte Hypothese 4 trifft somit zu. Bezüglich der immunogenen Wirkung dieses Impfstoffes bei Alpakas ist aus den vorliegenden Ergebnissen klar ersichtlich, dass nach zweimaliger Grundimmunisierung im Abstand von vier Wochen bei der Mehrzahl der geimpften Tiere (81,3 % - Bestand I; 91,7 % - Bestand II) messbare Antikörpertiter nachweisbar waren, die allerdings im Verlauf eines Jahres deutlich sanken (15,6 % - Bestand I; 45,8 % - Bestand II). Somit lässt sich Hypothese 5 nur teilweise bestätigen, da nach Ablauf eines Jahres nur bei einem Teil der Tiere weiterhin Antikörper messbar waren. Warum vier Tiere gar keine messbaren Antikörper zeigten und

warum die Titer in beiden Beständen im Verlauf eines Jahres so stark abfielen, bleibt ungeklärt. Nach Ansicht der Autorin erscheint es am wahrscheinlichsten, dass es sich hierbei um eine Alpaka-spezifische Reaktion auf die MVA-Impfung im ungeimpften Alpaka handelt. Ebenso konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass bei der Mehrzahl der getesteten neugeborenen Crias spezifische maternale Antikörper messbar waren, mit sehr großer Wahrscheinlichkeit abhängig vom positiven Impfstatus des Muttertieres. Hypothese 6 konnte somit bestätigt werden. Weiterhin zeigen die aktuellen Ergebnisse eindeutig, dass auf Grund von maternalen Antikörpern eine Impfung des Crias nicht vor der vollendeten 14. Lebenswoche stattfinden sollte (Publikation 3). Nach den aktuellen Ergebnissen kann festgehalten werden, dass der Einsatz des MVA-Impfstoffes bei Alpakas/Neuweltkameliden zu empfehlen ist.

In den Versuchen dieser Studie wurde in den Herden nicht nach CPXV-naiven und CPXV-exponierten Tieren unterschieden. Die Ergebnisse geben wieder, dass eine Impfung im CPXV-naiven Tier eine gute Immunantwort auslöst, allerdings nicht mit Antikörper-Titern in der Höhe, wie es eine Feldinfektion tun würde. Weiterhin konnte in der aktuellen Studie festgestellt werden, dass bei CPXV-exponierten Tieren der vorhandene Antikörpertiter einen Boost-Effekt erfährt. Derzeitige Erkenntnisse zur Immunantwort auf OPV-Infektionen gehen davon aus, dass durch eine überstandene Infektion eine lebenslange Immunität ausgelöst wird (HAMMARLUND et al. 2003; SLIFKA 2004). Stellt sich also die Frage, ob CPXV-exponierte Tiere tatsächlich geimpft werden müssen. Es ist bekannt, dass der MVA-Stamm genauso immunogen ist wie das Feldvirus (PRICE et al. 2013), allerdings bleibt unklar, ob im Fall einer neuen Feldinfektion gar keine klinischen Symptome oder ein milder Verlauf der Infektion auftritt. Experimentellen Infektionsversuchen bei Kaninchen und Javaner Affen ist zu entnehmen, dass eine Belastungsinfektion mit einem virulenten OPV-Stamm nach zweimaliger MVA-Impfung keine generalisierte Infektion auslöste, jedoch eine Primärpocke oder milde Hautläsionen klinisch apparent wurden (EARL et al. 2004; MUNZ et al. 1993). Auch nach den Ergebnissen dieser Studie schützt die Impfung mit großer Sicherheit vor einem generalisierten Verlauf der Infektion. Es lässt sich demnach schlussfolgern, dass die MVA-Impfung CPXV-naiver Tiere in der Lage ist, Tierverlust durch eine generalisierte Infektion zu verhindern, es bleibt allerdings offen, ob eine zoonotische Übertragung verhindert werden kann. Auch bleibt unklar, ob die ausgelöste Immunantwort ebenso lebenslangen Schutz bietet.

#### *Schlussfolgerungen und Ausblick:*

Die Tierart Alpaka ist ein vollemmpfänglicher akzidentieller Wirt für CPXV. Eine Erkrankung endet im schlimmsten Fall tödlich, milde Krankheitsverläufe führen zur vollständigen Rekonvaleszenz des Tieres und der Ausbildung eines wahrscheinlich lebenslangen Immunschutzes. Nach heutiger Erkenntnislage ist unklar, wie häufig diese Infektion in deutschen Alpakabeständen auftritt. Die vorliegende Studie

konnte herausfinden, wie das Virus in die Bestände getragen wird und wie die Ausbreitung in der Herde von statten geht. Anhand dieser Erkenntnisse muss festgehalten werden, dass es Faktoren gibt, die nicht oder derzeit nicht beeinflusst werden können: 1. ein ubiquitäres Erregerreservoir; 2. das Verhindern des Kontaktes zwischen Erregerreservoir und akzidentiellem Wirt; 3. die Natur der Tierart, Krankheiten erst äußerlich zu zeigen, wenn zumeist ein fortgeschrittener Krankheitszustand erreicht ist, in Kombination mit dem dichten Vlies der Tiere, was eine rein adspektorische Beurteilung der Haut fast unmöglich macht; und 4. eine Virusinfektion, für die keine kausale Therapiemöglichkeit zur Verfügung steht.

Dennoch konnte anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie die Erkenntnis gewonnen werden, dass Prävention in verschiedenen Bereichen möglich ist. Diese beinhaltet: a) optimale, artgerechte Haltungsbedingungen in Kombination mit einer ausgewogenen tierartgerechten Ernährung, was eine gesunde immunkompetente Herde mit niedriger Krankheitsanfälligkeit zur Folge hat; b) konsequent durchgeführte seuchenhygienische Maßnahmen im alltäglichen Umgang mit den Tieren, welche im Falle eines Viruseintrages in die Herde die unkontrollierte Ausbreitung des Virus in der gesamten Herde verhindern; c) eine gute Tierbeobachtung durch den Besitzer, die das frühzeitige Erkennen von Krankheitsanzeichen und das gezielte Separieren erkrankter Tiere aus der Herde ermöglicht; d) im Falle eines Erkrankungsausbruchs in der Herde, die sofortige MVA-Impfung aller nicht infizierter Tiere, um weitere Erkrankungen zu verhindern.

Im Fall eines Ausbruchs liegt es in der Hand des betreuenden Tierarztes, eine sorgfältige und alle Tiere umfassende Diagnostik und sofortige Hygiene- und Quarantänemaßnahmen einzuleiten. Besonders der Aspekt der zoonotischen Übertragung und ihrer Konsequenzen muss dem Besitzer eindringlich vermittelt werden. Klinische Symptome einer milden Verlaufsform können, wenn nötig, symptomatisch behandelt werden. Generalisierte Erkrankungsfälle haben nach den Erkenntnissen der vorliegenden Studie eine sehr schlechte Prognose und gelangen meist zu spät in die intensivmedizinische Betreuung, was die Wahrscheinlichkeit auf eine erfolgreiche Behandlung gegen null senkt.

Nach Einschätzung der Autorin und den Ergebnissen der vorliegenden Studie empfiehlt sich unter den nicht beeinflussbaren Grundvoraussetzungen die MVA-Impfung auch als generelle Schutzimpfung in CPXV-naiven Alpakas ab einem Alter von 3,5 Monaten und könnte idealerweise in den jährlichen Prophylaxeplan mit aufgenommen werden. Ob und in welchen Intervallen Wiederholungsimpfungen nach der Grundimmunisierung sinnvoll wären, bleibt allerdings offen. Leider erschweren die gesetzlichen Vorgaben, die den Einsatz dieses Impfstoffes derzeit nur mit zeitlich begrenzter Ausnahmegenehmigung erlauben, diese Empfehlung maßgeblich.

Aktuell eröffnet dieses Thema viel Raum für weitere Forschung und für Verbesserungen. Eine grundlegende Veränderung sollte der Status der Neuweltkameliden in Deutschland erfahren. Dies betrifft vor allem die Erhebung genauer jährlicher Tierzahlen und ein gezielt auf diese Tierarten abgestimmtes Tierseuchenpräventionsprogramm besonders in Hinblick auf Zoonosen. In Verbindung damit, wäre die Erforschung der Verbreitung und der Häufigkeit des Auftretens der CPXV-Infektion in deutschen Neuweltkameliden-Beständen wünschenswert. Weitere gezielte Studien zur Langlebigkeit der Schutzwirkung nach MVA-Impfung würden helfen, optimale Impfreime für diesen Impfstoff zu entwickeln. Schlussendlich würde ein für Tiere zugelassenes Medikament gegen OPV-Infektionen die akute Behandlung einer generalisierten Infektion maßgeblich erleichtern.

## 7 Zusammenfassung

**Verfasser:** Almut Prkno

**Titel:** Epidemiologische Untersuchungen zur Kuhpockenvirusinfektion beim Alpaka (*Vicugna pacos*)

**Institut/Klinik:** Klinik für Kleintiere, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

**Eingereicht im Januar 2020**

**Bibliographische Angaben:** 68 Seiten, 3 Publikationen mit insgesamt 5 Abbildungen und 8 Tabellen, 101 Literaturangaben im übergreifenden Dissertationsmanuskript

**Schlüsselwörter:** Cowpox virus (CPXV), Orthopockenviren, Alpaka, MVA, Zoonose

### Einleitung

Die Kuhpockenvirusinfektion (CPXV-Infektion) ist eine sporadisch auftretende, meldepflichtige Erkrankung mit zoonotischem Potenzial. Sie wurde in den letzten sechs Jahrzehnten in vielen Säugetierspezies inkl. des Menschen beschrieben und erforscht. Sie äußert sich in zwei Verlaufsformen: mild, lokalisiert, selbstlimitierend oder generalisiert, dramatisch bis letal. Als Erregerreservoir dienen dem Virus wildlebende Nagetiere (Wühlmäuse). Aktuell ist für diese Infektion keine kausale Therapie zugelassen, Prävention kann mittels prophylaktischer Impfung mit dem Modifizierten Vaccinia Virus Ankara (MVA)-Impfstoff erzielt werden. Für Neuweltkameliden wurde die CPXV-Infektion bisher nur dreimal beschrieben. Detaillierte Erkenntnisse zur Epidemiologie, klinischem Erscheinungsbild und Prävention dieser Infektion bei Neuweltkameliden fehlen. Vier unabhängige Cluster von CPXV-Infektion in ostdeutschen Alpakabeständen in nur fünf Jahren, bekannt geworden durch fünf Alpakas mit generalisierter CPXV-Infektion mit jeweils letalem Ausgang als Patienten der Klinik für Kleintiere Leipzig, gaben Anlass, die Infektion bei dieser Spezies genauer zu untersuchen.

### Ziele der Untersuchungen

Ziel der Studie war, auf Basis einer Literaturrecherche einen Überblick über das Wesen der CPXV-Infektion und ihre Relevanz bei Neuweltkameliden zu gewinnen. Anhand von Bestandsuntersuchungen in vier Alpakabeständen sollten Informationen zur Epidemiologie der CPXV-Infektion mit Erregernachweis im Einzeltier, Erregerverbreitung in der Herde und Erregerreservoir gesammelt werden. Ebenso wurde in zwei der vier Alpakabestände eine Bestandsimpfung mit dem MVA-Impfstoff durchgeführt, um die Verträglichkeit und die Immunogenität dieses Impfstoffes beim Alpaka zu überprüfen.

### Tiere, Material und Methoden

Vier Alpakabestände (107 Alpakas) wurden zweimal im Abstand von 19 – 54 Tagen besucht. Anhand der klinischen Untersuchung und verschiedener Proben (Blut, Tupferproben, Krusten von Hautläsionen, Kot) wurden CPXV-infizierte Tiere identifiziert. Wildlebende Nagetiere als potenzielles

Erregerreservoir wurden in der Umgebung der Bestände gefangen. Ein indirekter Immunfluoreszenztest (IFA) wurde zum Nachweis CPXV-spezifischer Antikörper aus dem Serum (Alpakas) bzw. Serum/Transsudat (Nager) eingesetzt, eine real-time PCR diente zum Nachweis von CPXV-spezifischer DNA aus Kot/Tupferproben/Krusten (Alpakas) bzw. Organproben (Nager). In zwei Alpakabeständen wurden 94 Tiere mit dem MVA-Impfstoff zweimal im Abstand von vier Wochen geimpft. Eine Ausnahmegenehmigung nach §17c Abs. 4 Nr. 2 Buchstabe a) des Tierseuchengesetzes vom 22. Juni 2004 (BGBl. I S. 1260) lag für beide Bestände vor. Vier Wochen nach jeder Impfung und 6 bzw. 12 Monate nach der 2. Impfung wurden von allen Tieren Serum (für IFA) und Tupferproben (für PCR) entnommen. Etwaige Impfreaktionen wurden vier Wochen nach jeder Impfung aufgezeichnet. Bei 14 Crias wurde 2 – 12 Wochen post partum eine Serumprobe auf spezifische maternale Antikörper untersucht.

### **Ergebnisse**

Insgesamt wurden 28 von 107 Tieren mittels IFA und/oder PCR als CPXV-infiziert identifiziert. Die Seroprävalenz pro Bestand schwankte zwischen 16,1 % und 81,2 %. Auch beim Alpaka traten zwei klinische Verlaufsformen auf: mild, lokalisiert, selbstlimitierend vs. generalisiert, letal. In zwei Beständen wurden CPXV-spezifische Antikörper in den gefangenen Nagern gefunden. Im dritten Bestand konnte CPXV aus einer Feldmaus (*Microtus arvalis*) isoliert werden. Vollgenomsequenzierung dieses Isolates und der Vergleich mit dem Genom von CPXV aus einem Alpaka des gleichen Bestandes ergaben 99,997 % Übereinstimmung. In diesem Bestand wurde CPXV an einer Bürste zur Fellpflege nachgewiesen, die Erregerübertragung durch indirekten Tierkontakt und tierbezogene Utensilien erscheint bei Alpakas am wahrscheinlichsten.

Die MVA-Impfung war auch bei Alpakas sicher und gut verträglich. Nach zweimaliger Grundimmunisierung konnte eine Antikörper-Seroprävalenz pro Bestand von 81,3 % bzw. 91,7 % nachgewiesen werden. Im Laufe eines Jahres sank diese auf 15,6 % bzw. 45,8 %, Neuerkrankungen wurden nicht detektiert. In 50,0 % der beprobten Crias wurden maternale Antikörper nachgewiesen.

### **Schlussfolgerungen**

Das ubiquitäre Erregerreservoir Wühlmaus in Verbindung mit an Popularität zunehmenden Alpakas, als vollemmpfängliche Spezies für CPXV weisen auf ein gesteigertes Risiko für zukünftige zoonotische CPXV-Infektionen hin. Die MVA-Impfung schützt Alpakas erfolgreich vor einer generalisierten CPXV-Infektion. Die Dauer des Impfschutzes und geeignete Auffrischungs-Impfregime gilt es in Langzeitstudien zu erforschen.



## 8 Summary

**Author:** Almut Prkno

**Title:** Epidemiological investigations of cowpox virus infection in alpacas (*vicugna pacos*)

**Institute/Department:** Department for Ruminants and Swine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

**Submitted in January 2020**

68 pages, 3 publications including 5 figures and 8 tables, 101 references

**Keywords:** Cowpox virus (CPXV), Orthopoxvirus, alpaca, MVA, zoonosis

### Introduction

Cowpox virus (CPXV) infection is a reportable and potentially zoonotic disease that occurs sporadically in a variety of animals and in humans. It has been extensively researched and described in both domestic and zoo animals as well as in humans. Although infected individuals generally have a mild form of disease, cases of fatal generalized CPXV infection have also been described. Prevention by prophylactic vaccination using modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccine is the only method of protecting animals against disease. CPXV infection has been described in South American camelids, but data on its epidemiology, clinical features and prevention are lacking. Four CPXV outbreaks occurred in unrelated alpaca herds in Eastern Germany in a five-year period. The diagnosis in those herds was based on five cases with severe, generalized and lethal CPXV infection referred to the Department for Ruminants and Swine in Leipzig. The outbreaks provided us with an opportunity to better understand CPXV-infection in this species.

### Aims of the study

The first aim of the study was to conduct a literature review of the clinical features of CPXV infection in South American Camelids and to compare their clinical signs with those of other animal species. The second goal was to evaluate the epidemiology of CPXV infection in four alpaca herds by evaluating the mode of virus transmission and the occurrence of CPXV in individual alpacas and in putative reservoir hosts. The third goal was to determine the safety and immunogenicity of MVA vaccine in alpacas by using in a prime-boost MVA vaccination regimen in two alpaca herds.

### Material and methods

Four alpaca herds (107 animals) were evaluated on two separate occasions, and samples (serum, swab samples, crusts of suspicious pox lesions, feces) were collected to identify CPXV-infected animals. Wild small mammals were trapped on the alpaca farms to investigate the potential source of infection. Serum (alpacas, rodents) and/or transudate (rodents) samples were used to detect CPXV-specific antibodies using an indirect immunofluorescence assay (IFA). Swab samples, crusts and feces (alpacas)

or organ tissue (rodents) were used for the detection of CPXV-specific DNA in a real-time PCR. A total of 94 animals from two alpaca herds were vaccinated twice with MVA vaccine. A special exemption was obtained from the relevant Ministries of the Federal States under German law. Blood samples (serum, IFA) and swab samples (PCR) were collected 4 weeks after prime and boost vaccination as well as 6 and 12 months after boost vaccination. In 14 crias, 1 blood sample was collected 2 – 12 weeks after birth to determine the presence of specific maternal antibodies (serum, IFA).

## **Results**

A total of 28 of 107 animals were diagnosed with CPXV using IFA and/or PCR. Herd seroprevalence ranged from 16.1% to 81.2%. The clinical signs in infected animals were mostly mild, localized and self-limiting, but 5 animals had generalized signs and died. In two herds, CPXV-specific antibodies were found in the local rodent population. In the third herd, CPXV was isolated from a common vole (*Microtus arvalis*); full genome sequencing and comparison with the genome of CPXV from an alpaca on the same farm revealed a 99.997% match. Virus transmission through indirect contact seems likely because CPXV-specific DNA was detected on a brush used for grooming. MVA vaccine was well tolerated and safe in vaccinated alpacas. Seroprevalence after booster vaccination was 81.3% in one herd and 91.7% in the other. Detectable antibody titers declined to 15.6% and 45.8% over a 12-month period after booster vaccination. New CPXV infections were not detected in this period. Specific maternal antibodies were detected in 50.0% of newborn crias.

## **Conclusions**

With the recent increase in their popularity, alpacas may pose an increased risk of zoonotic disease spread because of their susceptibility to CPXV infection and their relatively close proximity to reservoir hosts such as rodents. Prevention of generalized CPXV infection in alpacas using MVA vaccine appears feasible. The duration of immunity and appropriate booster vaccination regimens need to be verified in long-term studies.

## 9 Literaturverzeichnis

- Ade C. Freizeitspaß mit Lamas und Alpakas. Stuttgart (Hohenheim): Ulmer; 2015.
- Alzhanova D, Früh K. Modulation of the host immune response by cowpox virus. *Microbes Infect.* 2010;12(12-13):900–9.
- Basse A, Freundt EA, Falmer Hansen J. Ein Ausbruch von Pockenkrankheit bei Okapis im Kopenhagener Zoo. *Verh ber Erkrgr Zootiere.* 1964;6:55–62.
- Baxby D, Ashton DG, Jones DM, Thomsett LR. An outbreak of cowpox in captive cheetahs: virological and epidemiological studies. *J Hyg Camb.* 1982;89:365–72.
- Baxby D, Bennett M, Getty B. Human cowpox 1969-93: A review based on 54 cases. *Br J Dermatol.* 1994;131(5):598–607.
- Bennett M, Gaskell CJ, Gaskell RM, Baxby D, Gruffydd-Jones TJ. Poxvirus infection in the domestic cat: Some clinical and epidemiological observations. *Vet Rec.* 1986;118:387–90.
- Binder ED. Untersuchung zur Stressbelastung von Alpakahengsten in Einzel- versus Gruppenhaltung [Dissertation med. vet]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2014.
- Bomhard W von, Mauldin EA, Breuer W, Pfleghaar S, Nitsche A. Localized cowpox infection in a 5-month-old Rottweiler. *Vet Dermatol.* 2011;22(1):111–4.
- Boyle C, Isenbügel E. Lamas und Alpakas in der pädagogischen Förderung von Kindern und Jugendlichen. 2. Aufl. München: Reinhardt; 2015. (mensch & tier).
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL). Zahl der Woche: 13.000 Alpakas werden in Deutschland gehalten: Pressemitteilung Nr.39 vom 29.01.13, 2013 (zitiert vom 22.05.2016): <<http://www.bmelv.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/2013/039-Zahl-der-Woche.html>>.
- Campe H, Zimmermann P, Glos K, Bayer M, Bergemann H, Dreweck C et al. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(5):777–80.
- Cardeti G, Brozzi A, Eleni C, Polici N, D'Alterio G, Carletti F et al. Cowpox virus in llama, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(8):1513–5.
- Cardeti G, Gruber CEM, Eleni C, Carletti F, Castilletti C, Manna G et al. Fatal Outbreak in Tonkean Macaques Caused by Possibly Novel Orthopoxvirus, Italy, January 2015 1. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(12):1941–9.
- Carroll DS, Emerson GL, Li Y, Sammons S, Olson V, Frace M et al. Chasing Jenner's vaccine: Revisiting cowpox virus classification. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e23086.
- Chantrey J, Meyer H, Baxby D, Begon M, Bown KJ, Hazel SM et al. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol Infect.* 1999;122:455–60.
- Cranwell MP, Josephson M, Willoughby K, Marriott L. Louping ill in an alpaca. *Vet Rec.* 2008;162(1):28.
- Earl PL, Americo JL, Wyatt LS, Eller LA, Whitbeck JC, Cohen GH et al. Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature.* 2004;428(6979):182–5.
- Essbauer S, Meyer H, Porsch-Ozcürümez M, Pfeffer M. Long-lasting stability of vaccinia virus (orthopoxvirus) in food and environmental samples. *Zoonoses Public Health.* 2007;54(3-4):118–24.
- Essbauer S, Pfeffer M, Wilhelm S, Meyer H. Zoonotische Pockenviren. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz.* 2004;47(7):671–9.
- Essbauer S, Hartnack S, Misztela K, Kiessling-Tsalos J, Bäumler W, Pfeffer M. Patterns of orthopox virus wild rodent hosts in South Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009;9(3):301–11.

- Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H. Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):229–36.
- European medicines agency (EMA); 2019 (zitiert vom 7.12.2019): <<https://www.ema.europa.eu/en/medicines>>.
- Foster AP, Houlihan M, Higgins RJ, Errington J, Ibata G, Wakeley PR. BVD virus in a British alpaca. *Vet Rec.* 2005;156(22):718–9.
- Foster AP, Houlihan MG, Holmes JP, Watt EJ, Higgins RJ, Errington J et al. Bovine viral diarrhoea virus infection of alpacas (*Vicugna pacos*) in the UK. *Vet Rec.* 2007;161(3):94–9.
- Fowler ME, Bravo PW. *Medicine and surgery of camelids: [llama, alpaca, vicuña, guanaco, dromedary & Bactrian camels]*. 3rd ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2010.
- Franke A. Genetische Variabilität, Wirt-Assoziation und Pathogenität von Kuhpockenviren (CPXV) [Dissertation rer. nat]. Greifswald: Universität Greifswald; 2018.
- Franke A, Kershaw O, Jenckel M, König L, Beer M, Hoffmann B et al. Fatal Cowpox Virus Infection in an Aborted Foal. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016;16(6):431–3.
- Franke A, Pfaff F, Jenckel M, Hoffmann B, Höper D, Antwerpen M et al. Classification of Cowpox Viruses into Several Distinct Clades and Identification of a Novel Lineage. *Viruses.* 2017;9(6).
- Friedrich-Loeffler-Institut. Tiergesundheitsjahresbericht 2012 [2., ergänzende Fassung]; 2014 (zitiert vom 9.10.2019):<[https://www.openagrar.de/receive/openagrar\\_mods\\_00013204](https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00013204)>.
- Friedrich-Loeffler-Institut. Tiergesundheitsjahresbericht 2013; 2014 (zitiert vom 9.10.2019):<[https://www.openagrar.de/receive/openagrar\\_mods\\_00011129](https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00011129)>.
- Friedrich-Loeffler-Institut. Tiergesundheitsjahresbericht 2014 [2., korr. Fassung]; 2016 (zitiert vom 9.10.2019):<[https://www.openagrar.de/receive/openagrar\\_mods\\_00018696](https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00018696)>.
- Friedrich-Loeffler-Institut. Tiergesundheitsjahresbericht 2015; 2016 (zitiert vom 9.10.2019):<[https://www.openagrar.de/receive/openagrar\\_mods\\_00023542](https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00023542)>.
- Friedrich-Loeffler-Institut. Tiergesundheitsjahresbericht 2016; 2017 (zitiert vom 9.10.2019):<[https://www.openagrar.de/receive/openagrar\\_mods\\_00034675](https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00034675)>.
- Friedrich-Loeffler-Institut. Tiergesundheitsjahresbericht 2017 [Korrigierte Fassung]; 2018 (zitiert vom 8.10.2019):<<https://www.fli.de/de/publikationen/tiergesundheitsjahresberichte/>>.
- Gauly M, Vaughan J, Cebra C, editors. *Neuweltkameliden: Haltung, Zucht, Erkrankungen; 30 Tabellen.* 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Enke; 2011.
- Gazzani P, Gach JE, Colmenero I, Martin J, Morton H, Brown K et al. Fatal disseminated cowpox virus infection in an adolescent renal transplant recipient. *Pediatr Nephrol.* 2017;32(3):533–6.
- Gilbert SC. Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines. *Vaccine.* 2013;31(39):4241–6.
- Goerigk D, Merbach S. Klinische, pathologisch-anatomische und histopathologische Befunde bei einem Alpaka mit Böartigem Katarrhalfieber. *Tierärztl Prax.* 2012;40(G)(2):112–8.
- Goerigk D, Theuß T, Pfeffer M, Konrath A, Kalthoff D, Woll D et al. Kuhpockenvirusinfektion bei einem Alpaka (*Vicugna pacos*) - klinische Symptomatik, Diagnostik und pathologische Befunde. *Tierärztl Prax.* 2014;42(G)(3):169–77.
- Grund S. Morphometrische Untersuchung des Wachstums beim Alpaka (*Vicugna pacos*) von der Geburt bis zu einem Alter von 36 Monaten [Dissertation med. vet]. Leipzig: Universität Leipzig; 2014.
- Haller SL, Peng C, McFadden G, Rothenburg S. Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infect Genet Evol.* 2014;21:15–40.

- Halsby K, Twomey DF, Featherstone C, Foster A, Walsh A, Hewitt K et al. Zoonotic diseases in South American camelids in England and Wales. *Epidemiol Infect.* 2017;145(5):1037–43.
- Hammarlund E, Lewis MW, Hansen SG, Strelow LI, Nelson JA, Sexton GJ et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med.* 2003;9(9):1131–7.
- Hazel SM, Bennett M, Chantrey J, Bown K, Cavanagh R, Jones TR et al. A longitudinal study of an endemic disease in its wildlife reservoir: Cowpox and wild rodents. *Epidemiol Infect.* 2000;124(3):551–62.
- Hinrichs U, van de Poel H, van den Ingh TS. Necrotizing pneumonia in a cat caused by an orthopox virus. *J Comp Pathol.* 1999;121(2):191–6.
- Hoffmann D, Franke A, Jenckel M, Tamošiūnaitė A, Schluckebier J, Granzow H et al. Out of the Reservoir: Phenotypic and Genotypic Characterization of a Novel Cowpox Virus Isolated from a Common Vole. *J Virol.* 2015;89(21):10959–69.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses - Taxonomy; 2018 (zitiert vom 28.11.2019):<<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>.
- Jacobsen B, Algermissen D, Schaudien D, Venner M, Herzog S, Wentz E et al. Borna disease in an adult alpaca stallion (*Lama pacos*). *J Comp Pathol.* 2010;143(2-3):203–8.
- Jäger K, Steinborn P, Weider K, Wohlsein P. Kutane Infektion mit Orthopoxvirus bovis bei einem Wachtelhund. *Tierärztl Prax.* 2016;44(K)(4):273–7.
- Jeske K, Weber S, Pfaff F, Imholt C, Jacob J, Beer M et al. Molecular Detection and Characterization of the First Cowpox Virus Isolate Derived from a Bank Vole. *Viruses.* 2019;11(11).
- Kinnunen PM, Henttonen H, Hoffmann B, Kallio ER, Korthase C, Laakkonen J et al. Orthopox virus infections in Eurasian wild rodents. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11(8):1133–40.
- Knieriem A. Pockenerkrankung eines Asiatischen Elefantenbullens - Fallbericht einer generalisierten Infektion. Tagungsbericht Arbeitstagung der Zootierärzte im deutschsprachigen Raum. 2002;21:9–14.
- Kramski M, Mätz-Rensing K, Stahl-Hennig C, Kaup F-J, Nitsche A, Pauli G et al. A Novel Highly Reproducible and Lethal Nonhuman Primate Model for Orthopox Virus Infection. *PLoS ONE.* 2010;5(4):e10412.
- Kuntze A. Zur Klinik der Pocken bei Asiatischen Elefanten (*Elephas maximus*): 1. Mitteilung: Pockeneinbruch und -verlauf in einer elfköpfigen Elefantenherde. *Verh ber Erkrgr Zootiere.* 1974;16:281–8.
- Kurth A, Nitsche A. Cowpox in Zoo Animals. In: Miller RE, Fowler ME, editors. *Fowler's zoo and wild animal medicine: Current therapy.* 7th ed. St. Louis, Mo: Elsevier/Saunders; 2012. p. 32–7.
- Kurth A, Nitsche A. Detection of human-pathogenic poxviruses. *Methods Mol Biol.* 2011;665:257–78.
- Kurth A, Straube M, Kuczka A, Dunsche AJ, Meyer H, Nitsche A et al. Cowpox Virus Outbreak in Banded Mongooses (*Mungos mungo*) and Jaguarundis (*Herpailurus yagouaroundi*) with a Time-Delayed Infection to Humans. *PLoS ONE.* 2009;4(9):e6883.
- Kurth A, Wibbelt G, Gerber H-P, Petschaelis A, Pauli G, Nitsche A. Rat-to-elephant-to-human transmission of cowpox virus. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(4):670–1.
- Lauer J. Untersuchungen über die Wirksamkeit und Unschädlichkeit einer Schutzimpfung von Katzen gegen Pocken mit MVA-Lebendimpfstoff [Dissertation med. vet]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 1993.
- Macaldowie C, Patterson IAP, Nettleton PF, Low H, Buxton D. Louping ill in llamas (*Lama glama*) in the Hebrides. *Vet Rec.* 2005;156(13):420–1.

- MacLachlan NJ, Fenner F, Dubovi EJ, editors. Fenner's veterinary virology. 4. ed. Amsterdam: Academic Press; 2011.
- Mahnel H, Mayr A. Erfahrungen bei der Schutzimpfung gegen Orthopocken von Mensch und Tier mit dem Impfstamm MVA. Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 1994;107:253–6.
- Maksyutov RA, Gavrilova EV, Meyer H, Shchelkunov SN. Real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. J Virol Methods. 2015;211:8–11.
- Marennikova SS, Maltseva NN, Korneeva VI, Garanina NM. Outbreak of Pox Disease among Carnivora (Felidae) and Edentata. J Infect Dis. 1977;135(3):358–66.
- Martina BEE, van Doornum G, Dorrestein GM, Niesters HGM, Stittelaar KJ, Wolters, Marno A. B. I. et al. Cowpox Virus Transmission from Rats to Monkeys, the Netherlands. Emerg Infect Dis. 2006;12(6):1005–7.
- Mayr A, Czerny C-P. Cowpox Virus. In: Dinter Z, Morein B, editors. Virus infections of ruminants. Amsterdam, New York: Elsevier Science Pub. Co.; 1990. p. 9–15 (Virus infections of vertebrates; vol. 3).
- Mayr A, Hochstein-Mintzel V, Stickl H. Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. Infection. 1975;3(1):6–14.
- McFadden G. Poxvirus tropism. Nat Rev Microbiol. 2005;3(3):201–13.
- McInerney J, Papasouliotis K, Simpson K, English K, Cook S, Milne E et al. Pulmonary cowpox in cats: five cases. J Feline Med Surg. 2016;18(6):518–25.
- Meyer H. Summary report on first, second and third generation smallpox vaccines; 2013 (zitiert vom 28.4.2018):<[http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2013/november/2\\_Smallpox\\_vaccine\\_review\\_updated\\_11\\_10\\_13.pdf](http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2013/november/2_Smallpox_vaccine_review_updated_11_10_13.pdf)>.
- Mudry M, Meylan M, Regula G, Steiner A, Zanoni R, Zanolari P. Epidemiological study of pestiviruses in South American camelids in Switzerland. J Vet Intern Med. 2010;24(5):1218–23.
- Munz E, Linckh S, Renner-Müller IC, Reimann M. Die Wirksamkeit einer Immunisierung mit Vaccinia-Virus Stamm "MVA" gegen eine Infektion mit Kuhpocken-Virus Stamm "OPV 85" beim Kaninchen. Zentralbl Veterinärmed B. 1993;40(2):131–40.
- Neue Osnabrücker Zeitung (NOZ). Zahl der Alpakas in Deutschland steigt, 2018 (zitiert vom 25.05.2019):<<https://www.presseportal.de/pm/58964/4096230>>.
- Ninove L, Domart Y, Vervel C, Voinot C, Salez N, Raoult D et al. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. Emerg Infect Dis. 2009;15(5):781–4.
- Nitsche A. Untersuchungen zur Diagnostik und Risikobewertung von emerging and re-emerging Orthopockenviren in Deutschland [Habilschr. rer. nat]. Berlin: Charité-Universitätsmedizin Berlin; 2010.
- Oliveira GP, Rodrigues RAL, Lima MT, Drumond BP, Abrahão JS. Poxvirus Host Range Genes and Virus-Host Spectrum: A Critical Review. Viruses. 2017;9(11).
- Pfeffer M, Burck G, Meyer H. Kuhpockenviren in Deutschland: Eine Analyse von 5 Fällen aus dem Jahr 1998. Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 1999;112:334–8.
- Pilaski J, Jacoby F. Die Kuhpocken-Erkrankungen der Zootiere. Verh ber Erkrgr Zootiere. 1993;35:39–50.
- Pilaski J, Witzendorff P von, Brandt H-P, Höhr D. Ein Pockenausbruch bei Elefanten (*Elephas maximus*, *Loxodonta africana*) in einem Wanderzirkus während des Aufenthaltes im Winterquartier. Verh ber Erkrgr Zootiere. 1995;37:357–63.
- Price, Philip J R, Torres-Domínguez LE, Brandmüller C, Sutter G, Lehmann MH. Modified Vaccinia virus Ankara: innate immune activation and induction of cellular signalling. Vaccine. 2013;31(39):4231–4.

- Quenelle DC, Kern ER. Treatment of Vaccinia and Cowpox Virus Infections in Mice with CMX001 and ST-246. *Viruses*. 2010;2(12):2681–95.
- Rolle M, Mayr A. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre: 103 Tabellen. 9., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Enke; 2011.
- Roy CJ, Baker R, Washburn K, Bray M. Aerosolized cidofovir is retained in the respiratory tract and protects mice against intranasal cowpox virus challenge. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(9):2933–7.
- Schaller K, Pilaski J. Pocken bei Breitmaulnashörnern (*Ceratotherium s. simum*) im Zoologischen Garten Münster. *Zool Garten NF*. 1979;49(3):169–84.
- Schulz C, Beer M, Hoffmann B. Schmallenberg virus infection in South American camelids: Field and experimental investigations. *Vet Microbiol*. 2015;180(3-4):171–9.
- Schulz C, Eschbaumer M, Ziller M, Wäckerlin R, Beer M, Gauly M et al. Cross-sectional study of bluetongue virus serotype 8 infection in South American camelids in Germany (2008/2009). *Vet Microbiol*. 2012;160(1-2):35–42.
- Schüppel K-F, Menger S, Eulenberger K, Bernhard A, Pilaski J. Kuhpockeninfektion bei Alpakas (*Lama Glama pacos*). *Verh ber Erkr Zootiere*. 1997;38:259–65.
- Slifka MK. Immunological memory to viral infection. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(4):443–50.
- Smee DF. Orthopoxvirus inhibitors that are active in animal models: An update from 2008 to 2012. *Future Virol*. 2013;8(9):891–901.
- Theuß T, Goerigk D, Rasenberger S, Starke A, Schoon H-A. Sektionsbefunde von Neuweltkameliden. Eine retrospektive Analyse des Sektionsgutes des Leipziger Instituts für Veterinär-Pathologie. *Tierärztl Prax*. 2014;42(G)(5):278–88.
- Verordnung zum Schutz gegen die Verschleppung von Tierseuchen im Viehverkehr (Viehverkehrsverordnung - ViehVerkV) vom 3. März 2010 (BGBl. I S. 203); 2010.
- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Februar 2011 (BGBl. I S. 252), die zuletzt durch Artikel 381 der Verordnung vom 31. August 2015 (BGBl. I S. 1474) geändert worden ist; 2015.
- Vilsmeier B. Paramunity-inducing effects of vaccinia strain MVA. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 1999;112(9):329–33.
- Vogel S, Sárdy M, Glos K, Kortling HC, Ruzicka T, Wollenberg A. The Munich outbreak of cutaneous cowpox infection: Transmission by infected pet rats. *Acta Derm Venereol*. 2012;92(2):126–31.
- Volz A, Sutter G. Modified Vaccinia Virus Ankara: History, Value in Basic Research, and Current Perspectives for Vaccine Development. *Adv Virus Res*. 2017;97:187–243.
- Vorou RM, Papavassiliou VG, Pierroutsakos IN. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21(2):153–6.
- Wisser J, Pilaski J, Strauss G, Meyer H, Burck G, Truyen U et al. Cowpox virus infection causing stillbirth in an Asian elephant (*Elephas maximus*). *Vet Rec*. 2001;149:244–6.
- Wolfs TFW, Wagenaar JA, Niesters HGM, Osterhaus ADME. Rat-to-human transmission of Cowpox infection. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(12):1495–6.
- Żaba R, Jałowska M, Kowalczyk MJ, Bowszyc-Dmochowska M, Adamski Z, Szkaradkiewicz A. Cowpox virus infection in a child after contact with a domestic cat: A case report. *New Microbiol*. 2017;40(2):148–50.

Zanolari P, Chaignat V, Kaufmann C, Mudry M, Griot C, Thuer B et al. Serological survey of bluetongue virus serotype-8 infection in South American camelids in Switzerland (2007-2008). J Vet Intern Med. 2010;24(2):426–30.

Zwart P, Gipsen R, Peters JC. Cowpox in opakis (*Okapia johnstoni*) at Rotterdam Zoo. Br vet J. 1971;127:20–3.



## **10 Danksagung**

### **Ein ganz großes Dankeschön geht an:**

Alexander Starke, für die Möglichkeit dieses Projekt machen zu können und die wissenschaftliche Betreuung als Doktorvater.

Daniela Goerigk und Matthias Kaiser, für die wunderbare Zusammenarbeit, die immer guten Ratschläge und die Hilfe beim Durchführen des Projektes.

Martin Pfeffer, für die wundervolle Zusammenarbeit und Unterstützung, für die kostbare Zeit, die ich so oft in Anspruch nehmen durfte, für den fachlichen Input, die aufmunternden Worte und das viele Korrekturlesen.

Donata Hoffmann, für die großartige Zusammenarbeit und Unterstützung, für die fachlichen Ratschläge und die vielen inspirierenden Telefonate.

Thomas Vahlenkamp, Rainer Ulrich und Martin Beer, für ihr Mitwirken in diesem Projekt.

Alle Doktoranden und Mitarbeiter der Klinik für Kleintiere, als auch alle Mitarbeiter des FLI Riems, die mich bei meinem Projekt unterstützt haben.

### **Ein ganz besonderes Dankeschön geht an:**

Meine liebe Familie – Haukur, Arthur und Aaron – für ihre großartige Unterstützung und die viele Geduld.

Meine Eltern, meine zwei Schwestern, meine liebe Omi und meine Großeltern für ihre Unterstützung und die immer aufmunternden Worte.

Meine lieben Freunde – Annette Schroeder und Karsten Winter – für ihre Hilfe und Unterstützung.

All jene, die an mich und dieses Projekt geglaubt haben.